

ISSN 1023-2427

PHYSICS OF THE ALIVE

ФІЗИКА ЖИВОГО

Vol. 19
No. 2
2011

"Фізика живого" - теоретичне і науково-практичне видання, зорієнтоване на інформаційне сприяння розвитку фізики живого.

Головним призначенням журналу є публікація статей та повідомлень, що виявляють тенденцію переходу від традиційної біофізики до підходів "фізики живого". Цей перехід ґрунтується на застосуванні синергетичних і квантових принципів у теоретичному опису живого на всіх рівнях його ієрархічної організації.

Журнал має міждисциплінарний характер і розрахований на спеціалістів у галузях теоретичної фізики, біофізики, радіофізики, біології та медицини. Періодичність видання на рік один том.

Адреса редакції:

Україна, 01033, м Київ, вул. Володимирська, 61-б, редакція журналу "Фізика живого".

Електронна адреса: sitko@i.kiev.ua, [HTTP://WWW.SITKO-THERAPY.COM](http://www.sitko-therapy.com)

Видавець журналу — Науково-дослідний центр квантової медицини "Відгук" Міністерства охорони здоров'я України за сприяння Асоціації медичних фізиків України, Українського біофізичного товариства, Українського синергетичного товариства.

Видається на кошти Міжнародного благодійного фонду Сергія Сітька.

Свідоцтво про реєстрацію № 142 KB від 18.10.93 р.

The Aims and Scope

This Journal is a theoretical, scientific and practical publication aimed at information assistance to the development of Physics of the Alive.

It is expressly designed to publish articles and reports which describe the transition from traditional Biophysics to Physics of the Alive This approach is based on the application of synergetical and quantum mechanical principles to the theoretical description of life on all levels of its hierarchic organization.

This interdisciplinary edition is addressed to specialists in the fields of physics, biophysics, radiophysics, biology and medicine.

The Journal is published by Scientific Research Center (SRC) "Vidhuk" of the Ministry of Public Health of Ukraine (Kiev, Ukraine). The Editor is helped by members of the Association of Ukrainian Medical Physics, Ukrainian Biophysical Society, Ukrainian Synergetic Society.

Edition is realized at the expense of International Charity Fund of Sergei Sit'ko.

Mail Address:

SRC "Vidhuk " 61-B, Volodymyrska St, Kiev 01033, Ukraine

E-mail: sitko@i.kiev.ua, <http://www.sitko-therapy.com>

Всі права застережені. Жодна частина цього видання ні в якій формі і жодним способом (електронним, у вигляді фотокопії, магнітного запису або якимось іншим) не може бути відтворена, записана або передана без письмового дозволу видавця.

© 2003 "Vidhuk" All rights reserved. No part of this publication may be reproduced or utilized in any means, electronic or mechanical, including photocopying, or by any information storage or retrieval systems, without written permission of the Publisher.

Підписано до друку 25.11.2003 за рекомендацію Вченої ради НДЦ КМ "Відгук"
Формат 70x108_{1/16} Друк офс. Папір офс. № 1 Обл. вид. арк. 11,5

Ум-друк. арк. 9,8 Тираж 500 прим.

ISSN 1023-2427

© 2003, "Vidhuk"

КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА
НАВЧАЛЬНО-НАУКОВИЙ ЦЕНТР «ІНСТИТУТ БІОЛОГІЇ»

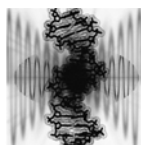
За сприяння Українського біофізичного товариства

ФІЗИКА ЖИВОГО
PHYSICS OF THE ALIVE
ФИЗИКА ЖИВОГО

Науковий журнал

Том 19, № 2

2011



**Київ
2011**

ФІЗИКА ЖИВОГО

Науковий журнал

Головний редактор:

Остапченко Л.І., д.б.н., проф., Київський національний університет імені Тараса Шевченка

Заступник головного редактора:

Мартинюк В.С., д.б.н., проф., Київський національний університет імені Тараса Шевченка

Редакційна колегія, Біологічні науки:

Белоусов Л.В., д.б.н., проф., Московський державний університет ім. М.В. Ломоносова, Росія

Войтенко З.В., д.б.н., проф., Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Україна

Говорун Д.М., д.б.н., проф., Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, Україна

Добронравова І.С., д.ф.н., Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Україна

Жолос О.В., д.б.н., проф., Королівський університет Белфаста, Великобританія

Ковтуненко В.О., д.б.н., проф., Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Україна

Костерін С.О., д.б.н., проф., Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Україна

Кришталь О.О., д.б.н., проф., акад. НАНУ, Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, Україна

Макарчук М.Ю., д.б.н., проф., Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Україна

Мірошніченко М.С., д.б.н., проф., Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Україна

Патика В.П., д.б.н., проф., Інститут мікробіології і вірусології НАН України, Україна

Чехун В.Ф., д.б.н., проф., Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р. Є. Кавецького НАН України, Україна

Шуба Я.М., д.б.н., проф., Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, Україна

Члени редакційної колегії. Фізика, кібернетика і математика:

Анісімов Л.А., д.ф.-м.н., проф., Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Україна

Брижик Л.С., д.ф.-м.н., проф., Інститут теоретичної фізики ім. М.М.Боголюбова НАН України, Україна

Булавін Л.А., д.ф.-м.н., проф., Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Україна

Григорук В.І., д.ф.-м.н., проф., Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Україна

Дел Джудіч Еміліо, проф., Національний інститут ядерної фізики, Італія

Перестюк М.О., д.ф.-м.н., проф., Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Україна

Сітько С.П., д.ф.-м.н., проф., Україна

Стріха М.В., д.ф.-м.н., проф., Інститут фізики напівпровідників ім. В.С.Лощарьова НАН України, Україна

Третяк О.В., д.ф.-м.н., проф., Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Україна

Чалий О.В., д.ф.-м.н., проф., Національний медичний університет імені О.О.Богомольця, Україна

Секретар редакційної колегії:

Торгало Є.О., к.б.н., Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Україна

Технічний секретар:

Крижанівський С.А., к.б.н., Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Україна

PHYSICS OF THE ALIVE

Scientific journal

Editor-in-Chief:

Ostapchenko L.I., prof., Taras Shevchenko National University of Kyiv

Executive Editor

Martyniuk V.S., prof., Taras Shevchenko National University of Kyiv

Editorial Board. Biological Sciences

Belousov L.V., prof., M.V. Lomonosov Moscow State University, Russia

Voitenko Z.V., prof., Taras Shevchenko National University of Kyiv, Ukraine

Govorun D.M., prof., Institute of Molecular Biology and Genetics NAS of Ukraine, Ukraine

Dobronravova I.S., prof., Taras Shevchenko National University of Kyiv, Ukraine

Zolos O.V., prof., Queen University of Belfast, Great Britain

Kovtunen V.O., prof., Taras Shevchenko National University of Kyiv, Ukraine

Kosterin S.O., prof., Institute of Biochemistry of NAS of Ukraine, Ukraine

Kryshchal O.O., prof., O.O.Bogomolets Institute of Biochemistry of NAS of Ukraine, Ukraine

Makarchuk M.Yu., prof., Taras Shevchenko National University of Kyiv, Ukraine

Miroshnychenko M.S., prof., Taras Shevchenko National University of Kyiv, Ukraine

Patyka V.P., prof., Institute of Microbiology of NAS of Ukraine, Ukraine

Chekhun V.F., prof., R.E. Kavetsky Institute of Experimental Pathology, Oncology and Radiobiology NAS of Ukraine, Ukraine

Shuba Ya.M., prof., O.O.Bogomolets Institute of physiology NAS of Ukraine, Ukraine

Editorial Board. Physics, Cybernetics and Mathematics:

Anisimov L.A., prof., Taras Shevchenko National University of Kyiv, Ukraine

Brizhyk L.S., prof., M.M. Bogolyubov Institute of Theoretical Physics NAS of Ukraine, Ukraine

Bulavin L.A., prof., Taras Shevchenko National University of Kyiv, Ukraine

Chaly O.V., prof., O.O.Bogomolets National Medical University, Ukraine

Grygoruk V.I., prof., Taras Shevchenko National University of Kyiv, Ukraine

Del Giudice E., prof., National Institute of Nuclear Physics, Italy

Perestyuk M.O., prof., Taras Shevchenko National University of Kyiv, Ukraine

Sytko S.P., prof., Ukraine

Strikha M.V., prof., V.E.Loshkarev Institute of Semiconductor Physics NAS of Ukraine, Ukraine

Tretiak O.V., prof., Taras Shevchenko National University of Kyiv, Ukraine

Secretary:

Torgalo T.O., Taras Shevchenko National University of Kyiv, Ukraine

Technical Secretary:

Kryzhanivsky S.A., Taras Shevchenko National University of Kyiv, Ukraine

БІОФІЗИКА. BIOPHYSICS.

МОЛЕКУЛЯРНА БІОФІЗИКА. MOLECULAR BIOPHYSICS

Микуляк В. В., Корнелюк О. І.

КОНФОРМАЦІЙНА РУХЛИВІСТЬ ТИРОЗИЛ-тРНК СИНТЕТАЗИ ЕУБАКТЕРІЇ M. TUBERCULOSIS ПО ДАНИМ КОМП'ЮТЕРНОГО МОДЕЛЮВАННЯ МОЛЕКУЛЯРНОЇ ДИНАМІКИ

4

БІОФІЗИКА НАНОМАТЕРІАЛІВ. BIOPHYSICS OF NANOMATERIALS

Таран Н.Ю., Бацманова Л.М., Лопатько К.Г., Мелешко А.О., Конотоп Є.О.

ВПЛИВ НЕІОННОГО КОЛОЇДНОГО РОЗЧИНУ НАНОЧАСТОК БІОГЕННИХ МЕТАЛІВ НА ВМІСТ ЕЛЕМЕНТІВ МЕТАЛІВ У РОСЛИННИХ ТКАНИНАХ

9

ЕЛЕКТРОМАГНІТНА ТА РАДІАЦІЙНА БІОФІЗИКА. ELECTROMAGNETIC AND RADIATION BIOPHYSICS

Богатина Н.И., Шейкина Н.В., Кордюм Е.Л.

ВЛИЯНИЕ ОРИЕНТАЦИИ КОРНЕЙ ОТНОСИТЕЛЬНО КОМБИНИРОВАННОГО МАГНИННОГО ПОЛЯ НА ИЗМЕНЕНИЕ ГРАВИТРОПИЧЕСКОЙ РЕАКЦИИ КОРНЕЙ КРЕСС-САЛАТА И КУКУРУЗЫ. ЭКСПЕРИМЕНТ И НОВАЯ ГИПОТЕЗА, МЕХАНИЗМ АДАПТАЦИИ

13

Семочко О.М., Мандзинець С.М., Бура М.В., Санагурський Д.І., Ференсович Я.П.

ВПЛИВ ВИПРОМІНЮВАННЯ СИНЬОГО ТА ЗЕЛЕНОГО СПЕКТРА НА ПРОЦЕСИ ЛІПОПЕРОКСИДАЦІЇ ЗАРОДКІВ В'ЮНА

24

МЕДИКО-БІОЛОГІЧНЕ ЗАСТОСУВАННЯ. MEDICAL-BIOLOGICAL APPLICATION

Держинський М.Е., Пустовалов А.С., Пазюк Л.М., Бузинська Н.О., Калиновський В.Є., Катькова О.В.

ДІЯ КІСПЕПТИНУ І МЕЛАТОНІНУ НА ГОНАДИ І КОРУ НАДНИРНИКІВ САМЦІВ ЩУРІВ

31

Хіміч М.В., Расцька Я.Б., Строцька Є.А., Преображенська Т.Д., Остапченко Л.І.

ВПЛИВ ПРЕПАРАТУ «ГРІНІЗАЦІЯ ГРІН R» НА ЗЛОЯКІСНИЙ РІСТ У ЩУРІВ З КАРЦИНОМОЮ ГЕРЕНА, А ТАКОЖ З РЕЗИСТЕНТНОЮ ФОРМОЮ КАРЦИНОМИ ГЕРЕНА

35

Нужина Н.В., Варенюк І.М., Орлова Н., Держинський М.Е.

ВПЛИВ МЕЛАТОНІНУ НА ГІПОТАЛАМО-ТИРЕОЇДНУ СИСТЕМУ ПТАХІВ: ЕФЕКТ БЛОКАДИ ДОФАМІНОВИХ D1-РЕЦЕПТОРІВ

39

Расцька Я.Б., Строцька Є.А., Хіміч М.В., Преображенська Т.Д., Остапченко Л.І.

СТАН АНТИОКСИДАНТНОЇ СИСТЕМИ І ПРОЦЕСІВ ПОЛ ПРИ ЗЛОЯКІСНОМУ РОСТІ У ЩУРІВ З РЕЗИСТЕНТНОЮ ФОРМОЮ КАРЦИНОМИ ГЕРЕНА ЗА УМОВ ВЕДЕННЯ «ГРІНІЗАЦІЯ ГРІН R»

44

Вишневська А.Г., Ковальова В.А., Гайда Л.М., Остапченко Л.І.

СТАН АНТИОКСИДАНТНОЇ СИСТЕМИ КЛІТИН ПІДШЛУНКОВОЇ ЗАЛОЗИ ЗА УМОВ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО УЛЬЦЕРОГЕНЕЗУ

48

Гарманчук Л. В., Сенчило Н.В., Нікуліна В.В., Деніс Є.О., Непийвода Х.Д., Ніколаєнко Т.В., Остапченко Л.І.

ЦИТОТОКСИЧНИЙ ВПЛИВ НА ПУХЛИННІ КЛІТИНИ *IN VITRO* АГЕНТІВ З ПРОТИПУХЛИННИМ ТА АНТИМЕТАСТАТИЧНИМ ЕФЕКТОМ

51

Таран Н.Ю., Бацманова Л.М., Лопатько К.Г., Каленська С.М.

ТЕХНОЛОГІЯ ЕКОЛОГІЧНО БЕЗПЕЧНОГО ВИКОРИСТАННЯ НАНОПРЕПАРАТІВ У АДАПТИВНОМУ РОСЛИННИЦТВІ

54

ДИСКУСІЯ DISCUSSION

Sit'ko S.P.

LIFE IN THE FUNDAMENTAL NOTIONS OF THE PHYSICS OF THE ALIVE

59



УДК 577.152.6

КОНФОРМАЦІЙНА РУХЛИВІСТЬ ТИРОЗИЛ-тРНК СИНТЕТАЗИ ЕУБАКТЕРІЇ *M. tuberculosis* ПО ДАНИМ КОМП'ЮТЕРНОГО МОДЕЛЮВАННЯ МОЛЕКУЛЯРНОЇ ДИНАМІКИ

¹Микуляк В.В., ^{1,2}Корнелюк О.І.

¹Інститут високих технологій, Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна;

²Інститут молекулярної біології і генетики Національної академії наук України, Київ, Україна;

e-mail: v.mykuliak@gmail.com

Надійшла до редакції 27.09.2011

Тирозил-тРНК синтетаза еубактерії *M. tuberculosis* (MtTyrRS) є ферментом, який каталізує приєднання тирозину до гомологічної тРНК на дорибосомному етапі синтезу білка у бактерій. Інгібування MtTyrRS може суттєво інгібувати ріст патогенних бактерій, тому MtTyrRS є перспективною мішенню для розробки нових протитуберкульозних препаратів, оскільки не здатна до перехресного розпізнавання та аміноацилювання цитоплазматичної тРНК^{Tyr} людини. В роботі проведено моделювання молекулярної динаміки (МД) димера MtTyrRS в розчині при умовах, наближених до фізіологічних, в часовому інтервалі 90 нс з використанням комп'ютерних ґрід-технологій та сервісів віртуальної лабораторії MolDynGrid. Отримані дані про високу антисиметричну конформаційну рухливість С-модулів відносно каталітичних N-модулів синтетази завдяки конформаційній гнучкості неструктурованого міжмодульного лінкера. Виявлена також висока конформаційна рухливість амінокислотних залишків в неструктурованій каталітичній петлі активного центра фермента, причому в процесі МД каталітична петля здатна формувати два антипаралельні динамічні β -стренди.

Ключові слова: тирозил-тРНК синтетаза *Mycobacterium tuberculosis*, молекулярна динаміка, GROMACS, ґрід-технології.

ВСТУП

Туберкульоз залишається однією з провідних причин смертності, причому майже третина світового населення інфікована збудником - патогенною еубактерією *Mycobacterium tuberculosis*. Щорічно приблизно у 8 млн. людей розвивається активний туберкульоз, що призводить до смерті 2 млн. людей у світі. Застосовувані сьогодні лікарські засоби вимагають призначення комбінації декількох протитуберкульозних препаратів, щонайменше, протягом 6 місяців. Ситуація ускладнюється швидкою появою нових резистентних штамів *M. tuberculosis*. Отже, зараз відчувається гострий брак нових протитуберкульозних препаратів [1]. Для цього необхідно здійснювати пошук нових білків-мішеней, інгібітори яких можуть бути новими протитуберкульозними лікарськими препаратами. Перспективним шляхом вирішення цієї проблеми є розробка нових ефективних інгібіторів бактеріальних аміноацил-тРНК синтетаз (aaRS) – ключових ферментів [2-4].

Тирозил-тРНК синтетаза еубактерії *M. tuberculosis* (MtTyrRS) є ферментом 1-го класу аміноацил-тРНК синтетаз, що каталізує високоспецифічне приєднання тирозину до гомологічної йому тРНК. Ця реакція є АТР-залежною, і відбувається в два етапи. На першому етапі з ферментом зв'язується тирозин та АТР, і утворюється проміжний продукт реакції естерифікації тирозиладенілат та вивільняється пірофосфат. На другому етапі, до MtTyrRS приєднується тирозил-тРНК і відбувається ковалентне приєднання до неї тирозину, після чого від фермента відщеплюється AMP та навантажена амінокислотою тирозил-тРНК^{Tyr} [5]. TyrRS еубактерії *Mycobacterium tuberculosis* (MtTyrRS) є гомодимером, що складається з двох ідентичних субодиниць. В структурі кожної субодиниці є N-кінцевий модуль і з'єднаний з ним через гнучкий лінкер С-кінцевий модуль [6]. N-кінцевий модуль в свою чергу складається з каталітичного та антикодонзв'язуючого доменів. Подібно всім аміноацил-тРНК синтетазам 1-го структурного класу, MtTyrRS містить згортку Россмана в активному центрі фермента та два

висококонсервативні каталітично важливі мотиви HIGH та KMSKS [5,7].

Інгібування ферментативної активності *MtTyrRS* є потенційним шляхом для пошуку і розробки нових ефективних і нетоксичних лікарських препаратів проти туберкульозу. Це обумовлено, по-перше, тим, що *TyrRS* належить до найбільш життєво-важливих білків клітини, а її інгібування має ефективно пригнічувати ріст патогенних бактерій, і по-друге, структура *MtTyrRS* значно відрізняється від цитоплазматичної *TyrRS* людини, яка має інший (еукаріотичний) тип просторової структури і значні відмінності в будові активного центру. Слід зазначити, що гомологія амінокислотних послідовностей цих двох *TyrRS* з різних організмів становить менше 20%. Важливо також відмітити, що *TyrRS* прокаріотичного і еукаріотичного типів не здатні до перехресного розпізнавання та аміноацилювання відповідних тРНК^{Tyr} [4].

Важливим аспектом при розробці нових інгібіторів ферментів є врахування динамічної структури білка і, особливо, динаміки його активного центра. Для цього необхідні детальні дослідження конформаційної рухливості білка в розчині в умовах, близьких до фізіологічних. Одним з найбільш ефективних методів вивчення динаміки білків в розчині зараз є метод комп'ютерного моделювання молекулярної динаміки (МД), який широко застосовується для дослідження особливостей функціонування біомолекул, в тому числі aaRS [8]. Слід зазначити, що використання сучасних комп'ютерних ґрид-технологій суттєво розширює можливості метода МД і дозволяє проводити розрахунки динаміки систем, які містять сотні тисяч атомів, у відносно довгих часових інтервалах.

В даній роботі проведено моделювання МД *in silico* димера *MtTyrRS* в розчині в часовому інтервалі 90 нс при умовах, наближених до фізіологічних. Отримані результати вказують на високу рухливість С-модулів синтетази відносно N-модулів завдяки конформаційній гнучкості міжмодульного лінкера, а також на рухливість є каталітичної неструктурованої петлі, яка містить структурний мотив KMSKS.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Розрахунки молекулярної динаміки в довгих часових інтервалах проведені з використанням ресурсів Українського Національного Ґриду, в тому числі використано 36 ядер суперкомп'ютера SKIT-3 Інституту кібернетики НАН України. Постановка задачі, її обрахунок та отримання було проведено з використанням сервісів віртуальної лабораторії MolDynGrid (<http://moldyngrid.org>) [9,10].

Для моделювання використано неповну просторову структуру *MtTyrRS*, визначену методом рентгеноструктурного аналізу (Protein Data Bank (PDB) код 2JAN) із роздільною здатністю 2,9 Å, проте в цій структурі відсутні деякі фрагменти

поліпептидного ланцюга. Для добудови відсутніх амінокислотних залишків в структурі петель субодиниці A: Met1-Met4 та Gly424; та субодиниці B: Met1-Met4 та Pro81-Asp93 в *MtTyrRS* було використано спеціалізований веб-сервер ModLoop [11,12], розроблений спеціально для добудови петель в білкових структурах. Оцінка якості структури проводилась за допомогою веб-сервера MolProbity [13]. З метою оптимізації отриманої структури, було проведено мінімізацію енергії білка за допомогою веб-сервера YASARA Energy Minimization Server [14]. Після мінімізації енергії знову було проведено оцінку якості отриманої просторової структури білка.

Розрахунки молекулярної динаміки *MtTyrRS* проводили за допомогою версії пакета програм GROMACS 4.5.1 [15]. Координати структури *MtTyrRS* спочатку було конвертовано з pdb формату у внутрішній формат GROMACS - gro. В розрахунках молекулярної динаміки використовували силове поле AMBER99SB-ILDN [16]. Структура білка розміщували в боксі, який має форму октаедра з мінімальною відстанню від стінок боксу до атомів білка 10 Å. Далі бокс було заповнено водою моделі SPC216, та нейтралізовано систему шляхом додавання іонів Na⁺ і Cl⁻ при концентрації 150 мМ. Після цього було виконано мінімізацію енергії системи у два підходи, спершу методом крутого спуску і потім методом спряженого градієнта. Далі у два підходи розраховувалась МД із позиційною прив'язкою атомів білка до їхніх вихідних координат. Результиуюча система вводилась як вхідна в розрахунок МД. Інтегрування здійснювалося кроками по 2фс. Координати атомів записувалися у файл траєкторії з періодичністю 2 пс. Електростатичні взаємодії враховувалися за методом PME, для ван-дер-вальсових взаємодій використовувалося подвійне усічення: на відстані 1,2 нм взаємодії враховувалися на кожному кроці. Температура і тиск системи підтримувалися постійними при 310 К (37°C) та 1бар, відповідно.

Конвертація траєкторій та їх нарізання на окремі фрейми виконувались за допомогою програми trjconv. Середньоквадратичні відхилення та флуктуації атомів від їхніх вихідних позицій розраховували за допомогою програм g_rms та g_rmsf, відповідно. Для побудови графіків по отриманих координатах було використано графічну програму Grace-5.1.22. Для візуалізації окремих фреймів фреймів використовували програму PyMOL-1.3 [17].

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

На графіку зміни середньоквадратичних відхилень (СКВ) С-альфа атомів від їхніх вихідних позицій в ході моделювання МД (рис 1.) видно, що отриману траєкторію конформаційних рухів *MtTyrRS* можна умовно поділити на дві стадії: релаксацію структури білка та власне динаміку білка після 20-ї нс.

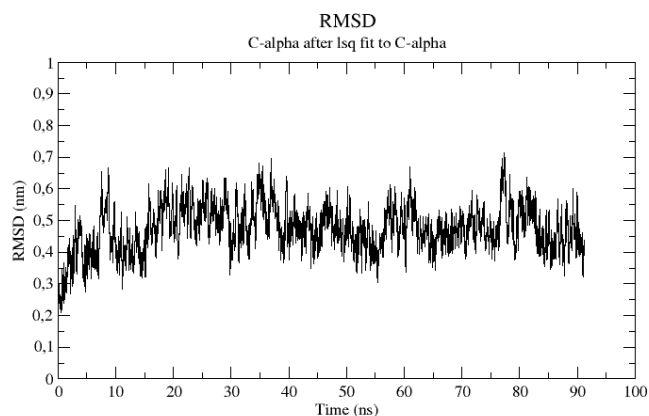


Рис. 1. Графік зміни середньоквадратичних відхилень С-альфа атомів від їхніх вихідних позицій в ході симуляції МД

На першому етапі СКВ зростають з часом і до 20-ї нс фермент набуває більш стабільного стану. На другому етапі СКВ коливаються в межах від 0,3 до 0,7 ангстрем. Така амплітуда СКВ зумовлена кількома чинниками. По-перше, димер *MtTyrRS* складається з 848 амінокислотних залишків, і тому такі СКВ припустимі для білка таких розмірів. По-друге, це зумовлено високою рухливістю С-модулів відносно каталітичних N-модулів в процесі МД.

Графік зміни середньоквадратичних флуктуацій (СКФ) С-альфа атомів від їхніх вихідних позицій в ході моделювання МД показує (рис 2.), що найбільш рухливими елементами білка є С-модулі завдяки конформаційній гнучкості міжмодульного лінкера, а також висококонсервативні неструктуровані каталітичні петлі синтетази, які містять KMSKS-подібний каталітичний мотив в *MtTyrRS* – KFGKS.

СКФ найбільш рухливих амінокислотних залишків каталітичних петель досягають 0,39 нм для Gly237 в субодиноці А та 0,47 нм для Gly237 в субодиноці В *MtTyrRS* (рис. 3).

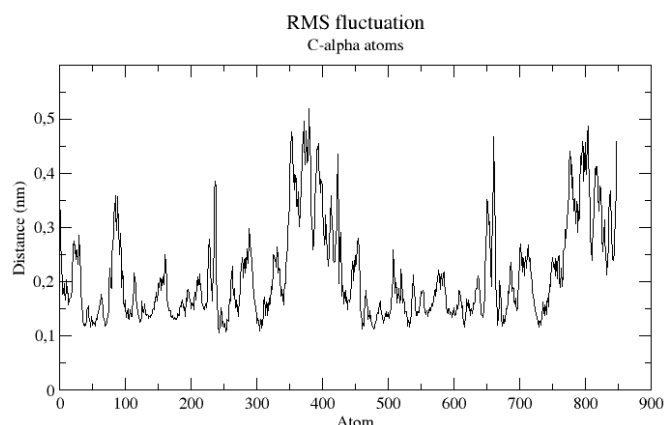


Рис. 2. Графік середньоквадратичних відхилень С-альфа атомів від їхніх вихідних позицій на другому етапі МД

Така висока рухливість цих амінокислотних залишків може бути пояснена природною неструктурованістю каталітичних петель в активному центрі фермента. Проте нами виявлено, що в процесі МД петля KFGKS здатна формувати у своїй структурі два антипаралельні динамічні β -стренди.

СКФ С-модулів *MtTyrRS* досягають 0,52 нм в субодиноці А та 0,49 нм в субодиноці В. Важливо відзначити, що конформаційні рухи С-модулів можна описати як почергове віддалення та наближення до каталітичних N-модулів (рис. 4).

Така поведінка білка дає підстави зробити висновок, що конформаційна рухливість окремих субодиноць в *MtTyrRS* добре корелює між собою в складі димера, і вірогідно така кореляція відбувається шляхом передачі конформаційних сигналів через інтерфейс субодиноць. Описані вище відхилення С-модулів в *MtTyrRS* відбуваються почергово для кожної субодиноць протягом всієї симуляції МД. На рис. 4 видно, що корельовано флуктуюючі С-модулі димера *MtTyrRS* приводять до формування антисиметричної конформації димера *MtTyrRS*.

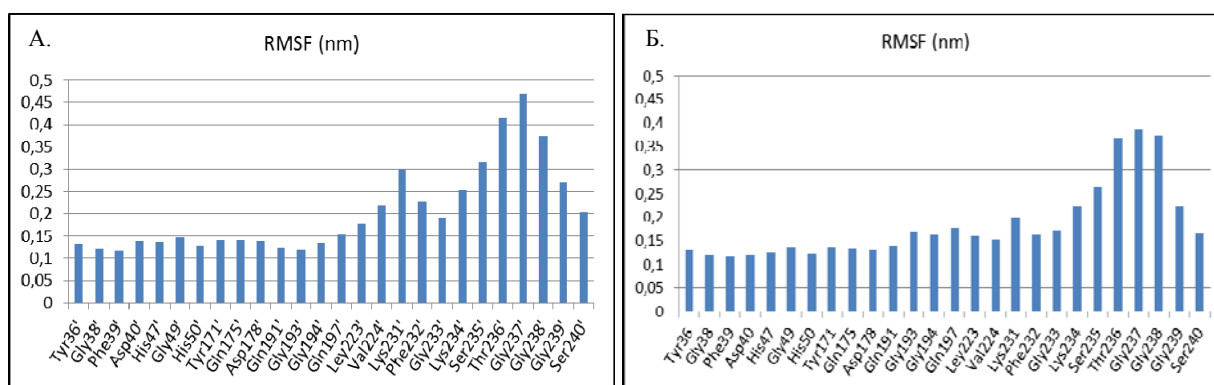


Рис. 3. Графік середньоквадратичних відхилень С-альфа атомів від їхніх вихідних позицій амінокислотних залишків активного центру субодиноць А (А) та субодиноць В (Б)

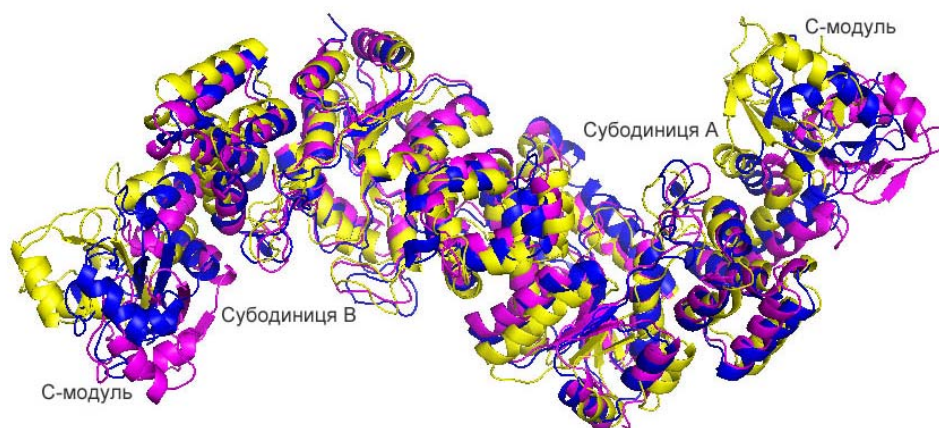


Рис. 4. Третинна структура димера *MtTyrRS*: до моделювання МД (голубий колір); з витягнутим С-модулем субодина A, (малиновий колір); з витягнутим С-модулем субодина B, (жовтий колір)

Відомо, що в бактеріальних тирозил-тРНК синтетазах при каталізі реакції аміноаціювання активні центри фермента, розміщені на кожній субодинаці, працюють по чергову [18-19]. Можливо, це є наслідком формування антисиметричної конформації димера *MtTyrRS*, виявленої нами в процесі молекулярної динаміки фермента.

На графіку зміни загальної площі поверхні димера *MtTyrRS* в процесі моделювання МД (рис. 5) видно, що існує тенденція до її зменшення, а отже до компактизації структури білка.

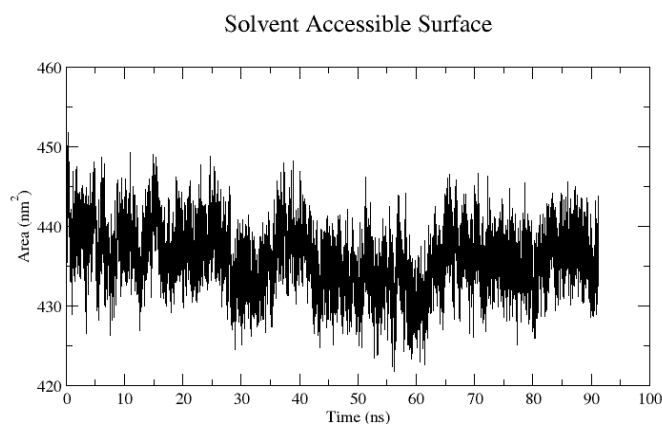


Рис. 5. Графік зміни загальної площі поверхні димера *MtTyrRS* в ході симуляції МД

Проте цей процес має флуктуативну природу, і на певних етапах динаміки площа поверхні білка знову збільшується. Цей ефект можна пояснити вище згаданою конформаційною рухливістю С-модулів відносно каталітичних N-модулів в процесі МД.

ВИСНОВКИ

Застосування комп'ютерних ґрид-технологій дозволило вперше провести розрахунки МД ключового фермента метаболізму туберкульозної палички *MtTyrRS* в розчині в часовому інтервалі 90 нс. Отримані результати вказують на антисиметричну конформаційну рухливість С-модулів відносно

каталітичних N-модулів синтетази завдяки конформаційній гнучкості неструктурованого міжмодульного лінкера. Виявлена висока конформаційна рухливість амінокислотних залишків в неструктурованій каталітичній петлі активного центра фермента та динамічне формування двох антипаралельних β -стрендів в процесі МД.

ПОДЯКА

Робота підтримана грантом №15/2011 Державної цільової науково-технічної програми впровадження і застосування ґрид-технологій на 2009 – 2013 роки.

Література

1. Koul A, Arnoult E, Lounis N, Guillemont J, Andries K. The challenge of new drug discovery for tuberculosis // *Nature*. – 2011. – Vol. 469. – P. 483-490.
2. Hoffmann M, Torchala M. Search for inhibitors of aminoacyl-tRNA synthetases by virtual click chemistry // *J Mol Model*. – 2009. – Vol. 15, No. 6. – P. 665-72.
3. Finn J, Stidham M, Hilgers M, G C K. Identification of novel inhibitors of methionyl-tRNA synthetase (MetRS) by virtual screening // *Bioorg Med Chem Lett*. – 2008. – Vol. 18, No. 14. – P. 3932-3937.
4. Eitner K, Gaweda T, Hoffmann M, Jura M, Rychlewski L, Barciszewski J. eHITS-to-VMD interface application. The search for tyrosine-tRNA ligase inhibitors // *J Chem Inf Model*. – 2007. – Vol. 47, No 2. – P. 695-702.
5. Bedouelle H. Tyrosyl-tRNA Synthetases. // *Madame Curie Bioscience Database* [Internet]. Austin (TX): Landes Bioscience. – 2000.
6. Yaremchuk A, Kriklyviy I, Tukalo M, Cusack S. Class I tyrosyl-tRNA synthetase has a class II mode of cognate tRNA recognition // *EMBO J*. – 2002. – Vol. 21, No 14. – P. 3829-3840.
7. Одинець К. О., Корнелюк О. І. Модель просторової структури тирозил-тРНК синтетази збудника туберкульозу *Mycobacterium tuberculosis* // *Укр.біохім.журн*. – 2008. – № 5. – С. 36-49.
8. Li T., Froeyen M, Herdewijn P. Comparative structural dynamics of Tyrosyl-tRNA synthetase complexed with different substrates explored by molecular dynamics // *Eur Biophys J*. – 2008. – Vol. 38, No 1. – P. 25-35.

9. Salnikov A.O., Sliusar I.A., Sudakov O.O., Savytskyi O.V., Kornelyuk A.I. Virtual laboratory moldyngrid as a part of scientific infrastructure for biomolecular simulations // International Journal of Computing. – 2010. – Vol. 9, No 4. – P. 294-300.
10. Сальников А.О., Судаков О.О., Савицький О.В., Слюсар Є.А., Корнелюк О.І. Інтегроване середовище віртуальної лабораторії MolDynGrid для розрахунків молекулярної динаміки біополімерів // Медична інформатика та інженерія – 2010. – Т. 3. – № 1. – С. 24-32.
11. Fiser A, Do RK, Sali A. Modeling of loops in protein structures // Protein Sci. – 2000. – V. 9 – P. 1753-1773.
12. Fiser A, Sali A. ModLoop: automated modeling of loops in protein structures // Bioinformatics. – 2003. – Vol. 19. – P. 2500-2501.
13. Vincent B. Chen, W. Bryan Arendall III, Jeffrey J. Headd, Daniel A. Keedy, Robert M. Immormino, Gary J. Kapral, Laura W. Murray, Jane S. Richardson and David C. Richardson. MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography // Acta Crystallographica. Biological Crystallography. – 2010. – Vol. 66. – P. 12-21.
14. Krieger E., Joo K., Lee J., Lee J., Raman S., Thompson J., Tyka M., Baker D., Karplus K. Improving physical realism, stereochemistry, and side-chain accuracy in homology modeling: Four approaches that performed well in CASP8 // Proteins – 2009. – Vol. 77. – P. 114-122.
15. Hess B., Kutzner C., Van Der Spoel D., et al. GROMACS 4: Algorithms for highly efficient, load-balanced, and scalable molecular simulation // J. Chem. Theory Comput. – 2008. - Vol. 4. - P. 435-447.
16. Hornak et. al Comparison of Multiple Amber Force Fields and Development of Improved Protein Backbone Parameters // Proteins. – 2006. - Vol. 65. - P. 712-725.
17. The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.3, Schrödinger, LLC.
18. Ward WH, Fersht AR. Asymmetry of tyrosyl-tRNA synthetase in solution. Biochemistry. 1988;27(3):1041–1049.
19. Ward WH, Fersht AR. Tyrosyl-tRNA synthetase acts as an asymmetric dimer in charging tRNA. A rationale for half-of-the-sites activity. Biochemistry. 1988;27(15):5525–5530.

КОНФОРМАЦИОННАЯ ПОДВИЖНОСТЬ ТИРОЗИЛ-тРНК СИНТЕТАЗЫ ЭУБАКТЕРИИ *M. tuberculosis* ПО ДАННЫМ КОМПЬЮТЕРНОГО МОДЕЛИРОВАНИЯ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ДИНАМИКИ

Микуляк В.В., Корнелюк А.І.

Тирозил-тРНК синтетаза эубактерии *M.tuberculosis* (MtTyrRS) является ферментом, который катализирует присоединение тирозина к гомологической тРНК на дорибосомном этапе синтеза белка. Ингибирование MtTyrRS может существенно ингибировать рост патогенных бактерий, поэтому [MtTyrRS](#) является перспективной мишенью для разработки новых противотуберкулезных препаратов, поскольку не способна к перекрестному распознаванию и аминоацилированию цитоплазматической тРНК^{Tyr} человека. В работе проведено моделирование молекулярной динамики (МД) димера MtTyrRS в растворе при условиях, приближенных к физиологическим, во временном интервале 90 нс с использованием компьютерных грид-технологий и сервисов виртуальной лаборатории MolDynGrid. Получены данные о высокой антисимметричной конформационной подвижности С-модулей относительно каталитических N-модулей синтетазы благодаря конформационной гибкости неструктурированных межмодульных линкеров. Обнаружена также высокая конформационная подвижность аминокислотных остатков в неструктурированной каталитической петле активного центра фермента, причем в процессе МД каталитическая петля способна формировать два антипараллельные динамические β-стрэнды.

Ключевые слова: тирозил-тРНК синтетаза *Mycobacterium tuberculosis*, молекулярная динамика, GROMACS, грид-технологии.

CONFORMATIONAL MOBILITY OF TYROSYL-tRNA SYNTHETASE FROM *M. tuberculosis* EUBACTERIA ACCORDING TO COMPUTER MODELING OF MOLECULAR DYNAMICS DATA

Mykuliak V.V., Kornelyuk A.I.

Tyrosyl-tRNA synthetase from *M. tuberculosis* eubacteria (MtTyrRS) is an enzyme that catalyzes the attachment of tyrosine to cognate tRNA at pre-ribosomal step of protein biosynthesis. Inhibition of [MtTyrRS](#) can significantly inhibit the growth of pathogenic bacteria, so MtTyrRS is promising target for developing of new antituberculosis drugs, since this bacterial enzyme is not able to cross-recognition and aminoacylation of human cytoplasmic tRNA^{Tyr}. In this paper the molecular dynamics simulation (MD) of the MtTyrRS dimer in solution was performed at conditions close to physiological ones, at the 90 ns time interval using computational grid technologies and services of MolDynGrid virtual lab. The high conformational mobility of the antisymmetric C-modules in relation to the catalytic N-modules of MtTyrRS was observed due to the conformational flexibility of unstructured intermodule linker. A high conformational flexibility of amino acid residues at the unstructured catalytic loop of enzyme active site was observed for MtTyrRS. Moreover, the catalytic loop is able to form two antiparallel dynamic β-strands in the course of MD simulation.

Key words: tyrosyl-tRNA synthetase, *Mycobacterium tuberculosis*, molecular dynamics, GROMACS, grid technologies.



ВПЛИВ НЕІОННОГО КОЛОЇДНОГО РОЗЧИНУ НАНОЧАСТОК БІОГЕННИХ МЕТАЛІВ НА ВМІСТ ЕЛЕМЕНТІВ МЕТАЛІВ У РОСЛИННИХ ТКАНИНАХ

Таран Н.Ю.¹, Бацманова Л.М.¹, Лопатько К.Г.², Мелешко А.О.¹, Конотоп Є.О.¹

¹ Київський національний університет імені Тараса Шевченка

² Національний університет біоресурсів і природокористування України
e-mail: l.batsmanova@gmail.com

Надійшла до редакції 10.09.2011

На атомно-абсорбційному спектрометрі визначено вміст елементів металів у рослинних тканинах за дії неіонного колоїдного розчину наночастинок металів (Fe, Mn, Cu, Zn) за умов передпосівної обробки насіння і позакореневої обробки 10-добових проростків пшениці. Показано, що наночастки металів завдяки своїм фізичним властивостям (нанорозмір та електронейтральність) здатні до швидкого проникнення в рослинні клітини та оптимізації метаболічних процесів на ранніх етапах росту та розвитку рослин.

Ключові слова: наночастки металів, пшениця, позакоренева обробка, передпосівна обробка.

ВСТУП

Нині наноматеріали і нанотехнології знаходять застосування практично в усіх галузях сільського господарства. На думку вчених, застосування нанотехнологій в сільському господарстві (при вирощуванні зерна, овочів, рослин і тварин) і на харчових виробництвах (при переробці і пакуванні) приведе до народження абсолютно нового класу харчових продуктів - "нанопродуктів", які з часом витіснять з ринку генномодифіковані продукти. [5].

У рослинництві застосування нанопрепаратів, в якості мікродобрив, забезпечує підвищення стійкості до несприятливих кліматичних умов і збільшення врожайності (в середньому в 1,5-2 рази) майже усіх продовольчих (картопля, зернові, овочеві і плодово-ягідні) і технічних (бавовник, льон) культур [3]. Біологічно активні наночастки заліза можуть підвищити врожайність деяких зернових культур від 10 до 40% [8]. Очікується також позитивний вплив наноматеріалів на продуктивність фотосинтезу [1]. Нанотехнології застосовуються після збирання врожаю соняшнику, тютюну і картоплі, для зберігання яблук [9].

Нанопрепарати мають низку переваг порівняно з традиційними розчинами: не розшаровуються під впливом тепла і світла, приготовлений робочий розчин може зберігатися не години або дні, а роки, залишаючись при цьому активним. Проте найголовніше - нанопродукти забезпечують повне змочування поверхні рослин, повністю всмоктуються

рослинами, не змиваються дощем. Виробники не приховують, що наноемульсії недешеві, але у результаті вони дають набагато більший ефект. Наприклад, обробка озимої пшениці препаратом "Титул Дуо, КРР" може забезпечити до 400% рентабельності і додатковий урожай до 17 центнерів з гектара [1].

Перспективним напрямком використання нанопрепаратів вважається їхнє застосування у дуже низьких концентраціях з метою отримання екологічно чистої продукції. Наночастки, завдяки своєму малому розміру, що обчислюється в нанометрах, легко проникають в клітини тварин і людини, трохи важче - в клітини рослин, унаслідок наявності целюлозної клітинної стінки. Не так давно вчені поставили ще одне питання: чи можуть наночастки проникати у насіння рослин, оболонка яких ще товща? В науковій літературі є повідомлення про здатність багатостінних вуглецевих нанотрубок проникати крізь оболонку насіння томатів [6]. Особливості проникнення і транслокації у рослинних тканинах наночастинок металів нині на стадії вивчення і отримані данні найчастіше суперечливі.

Метою нашої роботи було з'ясувати вміст елементів металів у рослинних тканинах за передпосівної обробки насіння та позакореневої обробки надземної частини проростків озимої пшениці неіонним колоїдним розчином наночастинок металів.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Рослини пшениці сорту Київська 8 вирощувались в умовах піщаної культури з моделюванням способів використання препаратів у промислових умовах агропромисловості. Одна частина проростків вирощувалась за умов передпосівної обробки насіння колоїдним розчином суміші наночастинок металів (Fe, Mn, Cu, Zn). Насіння намочувалося на добу у розчині наночастинок металів у концентрації 120 мг/л. Інша модель відтворювала позакореневий спосіб внесення препарату. Для цього – спочатку вирощувалися 10-добові проростки і обприскувалися водним розчином суміші наночастинок металів. Обробляли за такою ж схемою насіння і проростки розчинами окремих наночастинок металів Fe, Mn, Cu, Zn. Колоїдний розчин наночастинок металів, використаний у дослідженнях, розроблений кафедрою технології конструкційних матеріалів і матеріалознавства НУБіП України, отримані диспергуванням гранул заліза, міді, марганцю, цинку імпульсами електричного струму з амплітудою 100-2000 А у воді [3]. Один контрольний варіант - насіння намочували на добу у дистильованій воді, інший – надземну частину проростків обприскували водою. Визначався вміст металів у коренях і надземній частині 10-добових проростків пшениці на атомно-абсорбційному спектрометрі, обладнаному ацетиленовим пальником і комплектом спектральних ламп згідно методики [4]. Математичну обробку даних проводили методом дисперсійного аналізу. Достовірність різниці між варіантами оцінювали за критерієм Стюдента при рівні значущості $P < 0,05$ [2].

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Як показують результати наших досліджень за обробки насіння окремими елементами наночастинок металів різні елементи розподіляються по-різному у тканинах коренів та надземної частини проростків (рис. 1.).

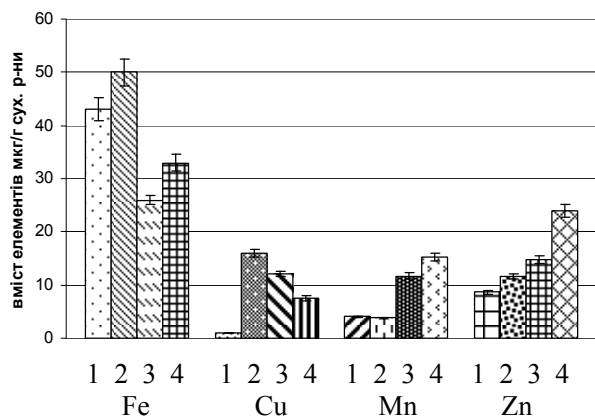


Рис. 1. Вміст елементів металів у тканинах проростків пшениці за дії наночастинок відповідних металів: 1-контроль корені; 2 – дослід корені; 3- контроль листки; 4-дослід листки.

Так, за обробки насіння наночастинами заліза, його вміст збільшується у тканинах коренів та у фотосинтетичних тканинах проростків на 16% та 26% відповідно. Аналогічна картина спостерігається з накопиченням цинку - у коренях його вміст збільшувався на 34%, листках – 61%. За обробки наночастинами міді вміст міді збільшується у коренях (на 94%), а у листках зменшується (на 38%). Вміст марганцю збільшувався у листках дослідних варіантів (на 30%), а у коренях залишався на рівні контрольних варіантів.

Отже, отримані результати вказують на здатність наночастинок металів проникати крізь оболонку насінини. Розподіл елементів по тканинах рослин визначається їхньою здатністю до проникнення та особливостями транспортування по рослині.

Нині широкого розповсюдження у рослинництві набувають фоліари, водні розчини солей мікроелементів, які використовуються для позакореневого підживлення. Проникність цих мікродобрив через кутикулу листка лімітується електрохімічним потенціалом та неповною розчинністю солей. Використання елементів менших розмірів та електронейтральних, зокрема наночастинок металів, дозволить підвищити ефективність мікродобрив. Ми дослідили як спосіб обробки наночастинами металів (передпосівна і обприскування надземної частини) впливає на накопичення металів у коренях та надземній частині (рис. 2, 3, 4, 5).

За обробки насіння сумішшю наночастинок металів з наступним визначенням вмісту окремих металів у надземній частині і коренях ми з'ясували, що вміст заліза зменшувався як у коренях (44%), так і у надземній частині (27%), вміст міді зменшувався у коренях (17,5%), а у надземній частині збільшувався на 12,5%, вміст марганцю зростав як у коренях (25%), так і надземній частині (84%), вміст цинку зменшувався у коренях (66%), - зростав у надземній частині (42%).

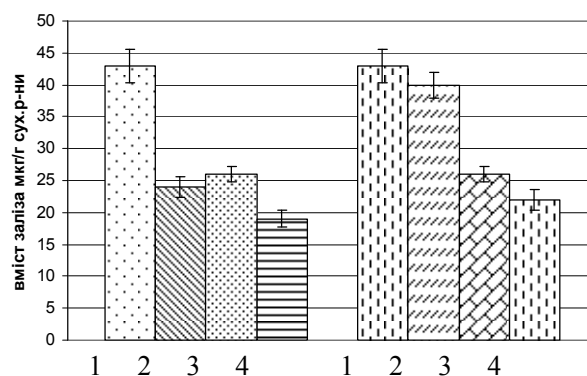


Рис. 2. Вміст заліза у тканинах проростків пшениці при обробці сумішшю наночастинок металів насіння (а) та вегетативної маси (б): 1-контроль корені; 2 – дослід корені; 3- контроль листки; 4-дослід листки.

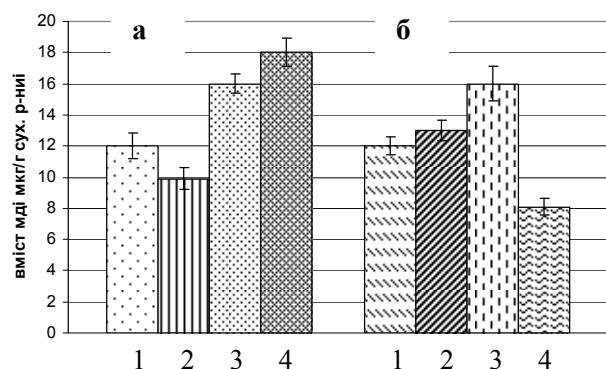


Рис. 3. Вміст міді у тканинах проростків пшениці при обробці сумішшю наночастинок металів насіння (а) та вегетативної маси (б): 1-контроль корені; 2 – дослід корені; 3- контроль листки; 4-дослід листки.

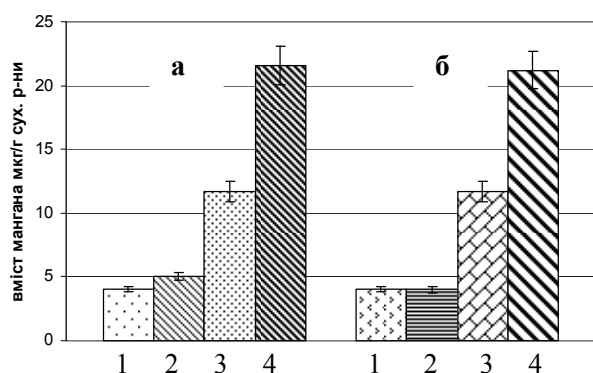


Рис. 4. Вміст мангану у тканинах проростків пшениці при обробці сумішшю наночастинок металів насіння (а) та вегетативної маси (б): 1-контроль корені; 2 – дослід корені; 3- контроль листки; 4-дослід листки.

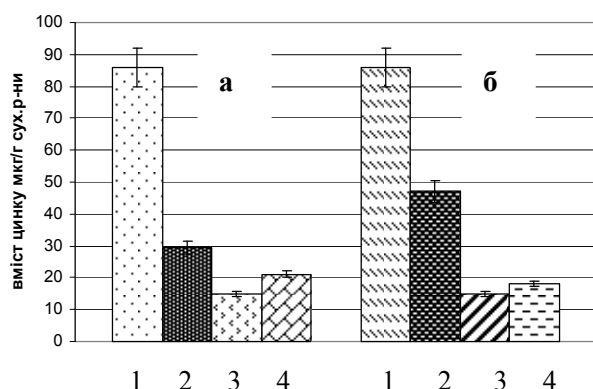


Рис. 5. Вміст цинку у тканинах проростків пшениці при обробці сумішшю наночастинок металів насіння (а) та вегетативної маси (б): 1-контроль корені; 2 – дослід корені; 3- контроль листки; 4-дослід листки.

За обприскування надземної частини сумішшю наночастинок металів вміст заліза, міді та мангану у коренях залишався на рівні контрольних варіантів, а у надземній частині кількість заліза зменшувалася на 15%, міді на 49%, мангану зростала на 81%. Вміст

цинку у коренях зменшувався на 45%, а у надземній частині зростає (23%).

ВИСНОВКИ

Отже, за обробки надземної частини нанопрепаратами проникнення наночастинок металів відбувається через епідерміс, продихи. Наночастки металів швидше транспортуються по рослині, включаються у метаболічні процеси. Ефект їхньої дії можна спостерігати вже через 2 години після використання, тоді як дія звичайних фоліарів виявляється через 6-8 годин. Коливання вмісту окремих елементів металів у тканинах рослин, можливо, пов'язане з метаболічною регуляцією гомеостазу на рівні клітини, тобто зі здатністю наночастинок до оптимізації метаболічних процесів, а вміст елементів зростає у тих тканинах де їхня активність необхідна, оскільки досліджувані елементи входять до складу органічних молекул, зокрема ферментів. Отримані результати вказують на те, що елементи металів не накопичуються у рослинних тканинах, що є необхідним екологічно позитивним фактором для продуктів рослинництва.

Роботу виконано за фінансової підтримки Державного агентства з питань науки, інновацій та інформатизації України (за договором № ДЗ/ 493-2011 від 29 вересня 2011 р.)

Література

1. Бовсуновський А.М., Вялый С.О., Каптуренко В.Г., Косинов Н.В. Нанотехнология как движущая сила аграрной революции //Зерно.- 2008.- № 11(31).- С.80-83.
2. Доспехов Б.А. Методика полевого опыта. – М.: Агропромиздат, 1985.- 350 с.
3. Лопатько К.Г., Афтандіянц Є.Г., Каленська С.М., Тонха О.Л. «Спосіб отримання неіонного колоїдного розчину металів».- Патент на винахід №38459 від 12.01.2009.
4. Analytical methods for atomic absorption spectrophotometry.- 1982.- Perkin-Elmer, Norwalk. - P. 138-144.
5. Chau C.F. The development of regulations for food nanotechnology. //Trends Food Sci. Technol.- 2007.- V.18.- P. 269–280.
6. Khodakovskaya M., Dervishi E., Mahmood M., Xu Y., Li Z., Watanabe F., Biris A. Carbon Nanotubes are able to penetrate plant seed coat and dramatically affect seed germination and plant growth // ACS Nano.- 2009.- №3.- P. 3221–3227.
7. Lin D., Xing B. Phytotoxicity: of Nanoparticles: inhibition of seed germination and root growth. // Environ. Pollut. -2007.- V.150.- P. 243–250.
8. Racuiu M, Creanga D. Cytogenetic changes induced by beta-cyclodextrin coated Nanoparticles in plant seeds. // Romanian J. Phys.- 2009.- V.54.- P. 125–131.
9. Sozer, N.; Kokini, J.L. Nanotechnology and its applications in the food sector. //Trends Biotechnol. – 2009.- V. 27.- P. 82–89.

ВЛИЯНИЕ НЕИОННОГО КОЛЛОИДНОГО РАСТВОРА НАНОЧАСТИЦ БИОГЕННЫХ МЕТАЛЛОВ НА СОДЕРЖАНИЕ ЭЛЕМЕНТОВ МЕТАЛЛОВ В РАСТИТЕЛЬНЫХ ТКАНЯХ

Таран Н.Ю., Бацманова Л.М., Лопатко К.Г., Мелешко А.А., Конотоп Е.А.

На атомно-абсорбционном спектрометре определено содержание элементов металлов в растительных тканях при воздействии неионного коллоидного раствора наночастиц металлов (Fe, Mn, Cu, Zn) в условиях предпосевной обработки семян и внекорневой обработки 10-дневных проростков пшеницы. Показано, что наночастицы металлов благодаря своим физическим свойствам (наноразмеры и электронейтральность) способны к быстрому проникновению в растительные клетки и оптимизации метаболических процессов на ранних этапах роста и развития растений.

Ключові слова: наночастицы металлов, пшеница, внекорневая обработка, предпосевная обработка.

INFLUENCE OF NON-IONIC COLLOID SOLUTION OF NANOPARTICLES OF BIOGENIC METALS ON METAL CONTENT IN PLANTS TISSUES

Taran N. Yu., Batsmanova L.M., Lopatko K.G., Meleshko A.O., Konotop Ye.O.

Contents of metals in plant tissues under foliar treatment of 10-day-old wheat seedlings and presowing treatment of seeds by non-ionic colloid solution of metals nanoparticles (Fe, Mn, Cu, Zn) were determined by atomic absorption spectrometer. It has been shown that metal nanoparticles due to their physical properties (size and electroneutrality) capable to penetrate rapidly into the plant cell and help to optimize metabolic processes at the early stages of plants growth and development.

Key words: metals nanoparticles, wheat, foliar treatment, presowing treatment.



УДК 577.1

**ВЛИЯНИЕ ОРИЕНТАЦИИ КОРНЕЙ ОТНОСИТЕЛЬНО КОМБИНИРОВАННОГО
МАГНИТНОГО ПОЛЯ НА ИЗМЕНЕНИЕ ГРАВИТРОПИЧЕСКОЙ РЕАКЦИИ КОРНЕЙ
КРЕСС-САЛАТА И КУКУРУЗЫ.
ЭКСПЕРИМЕНТ И НОВАЯ ГИПОТЕЗА, МЕХАНИЗМ АДАПТАЦИИ**

Богатина Н.И., Шейкина Н.В., Кордюм Е.Л.

*Физико-технический институт низких температур им. Б.И. Веркина НАН Украины, Харьков, Украина
e-mail: n_bogatina@rambler.ru*

*Национальная фармацевтическая академия, Харьков, Украина
e-mail: sheykina@ukr.net*

*Институт ботаники им. Н.Г. Холодного НАН Украины, Киев, Украина
e-mail: cellbio@ukr.net*

Поступила в редакцию 25.08.2011

Экспериментально показано, что гравитропическая реакция растений зависит от направления корней относительно комбинированного магнитного поля (КМП). При расположении корней перпендикулярно КМП гравитропическая реакция корней изменяется: становится либо положительной, либо вообще отсутствует. Если же корни расположены параллельно КМП, то гравитропическая реакция качественно такая же, как и в контроле (постоянном магнитном поле ПМП). Эти эффекты и ранее полученные результаты хорошо согласуются с гипотезой Либова о необходимости учета электрического поля мембраны и нашей моделью, которая была изменена (было учтено электрическое поле мембраны). Эта модель позволила объяснить влияние как КМП, так и ПМП. Пользуясь ею можно утверждать, что основной поток ионов Ca^{2+} направлен вдоль корней. Основную роль играет электрическое поле мембраны клетки. Учет его величины позволяет убрать все возражения о невозможности действия КМП, т.к. мала его энергия. КМП является спусковым механизмом, освобождающим энергию клетки. С помощью КМП, можно регулировать скорость кальциевого обмена в клетке. Обсуждается возможный механизм адаптации клеток к КМП.

Ключевые слова: комбинированное магнитное поле, гравитропическая реакция корней, кресс-салат, кукуруза.

ВВЕДЕНИЕ

Ранее было показано, что комбинированное магнитное поле (КМП), направленное параллельно силе тяжести, может существенно изменить гравитропическую реакцию растений [1-5]. Эффекты наблюдаются для определенных частот переменной составляющей комбинированного магнитного поля, формально совпадающих с циклотронными частотами ионов Са, К, Си, ауксина, абсцизовой кислоты, гиббереллинов (КМП – это коллинеарные постоянное и переменное магнитное поле). Особенно велик эффект для частоты переменной составляющей, совпадающей с циклотронной частотой ионов Ca^{2+} . В этом случае изменяется знак гравитропической реакции как для корней кресс-салата, так и гороха. До настоящего времени нет общей теории, объясняющей все наблюдаемые эффекты. Поэтому очень важно выяснить, зависит ли наблюдаемый эффект от направления корней относительно направления магнитного поля. Именно этому вопросу и посвящена настоящая работа.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Схема используемой установки приведена на рис.1.

Пермалловый экран с дном 2 размещали на резине 1, демпфирующей вибрации. Внутри экрана располагались кольца 3 из немагнитного материала, центрирующие обмотки соленоида 4 и 5 относительно центральной оси экрана. Обмотка 5 использовалась для создания постоянного магнитного поля в соленоиде, обмотка 4 - для создания переменного магнитного поля в соленоиде, 6 – подставка из немагнитного материала, на которой была размещена влажная камера 9 с образцами (корнями кресс-салата и кукурузы). В камере 9 на подставке 7 размещали корни 8 (двухсуточные проростки кресс-салата или кукурузы). Корни можно было расположить в горизонтальной плоскости как параллельно вектору магнитного поля, направленного вдоль оси экрана, так и перпендикулярно вектору магнитного поля. В обоих случаях корни располагались перпендикулярно вектору силы

тяжести. Температура в камере стабилизировалась с точностью до $\pm 0.2^\circ \text{C}$. Внешний вид установки

СХЕМА ЭКСПЕРИМЕНТА

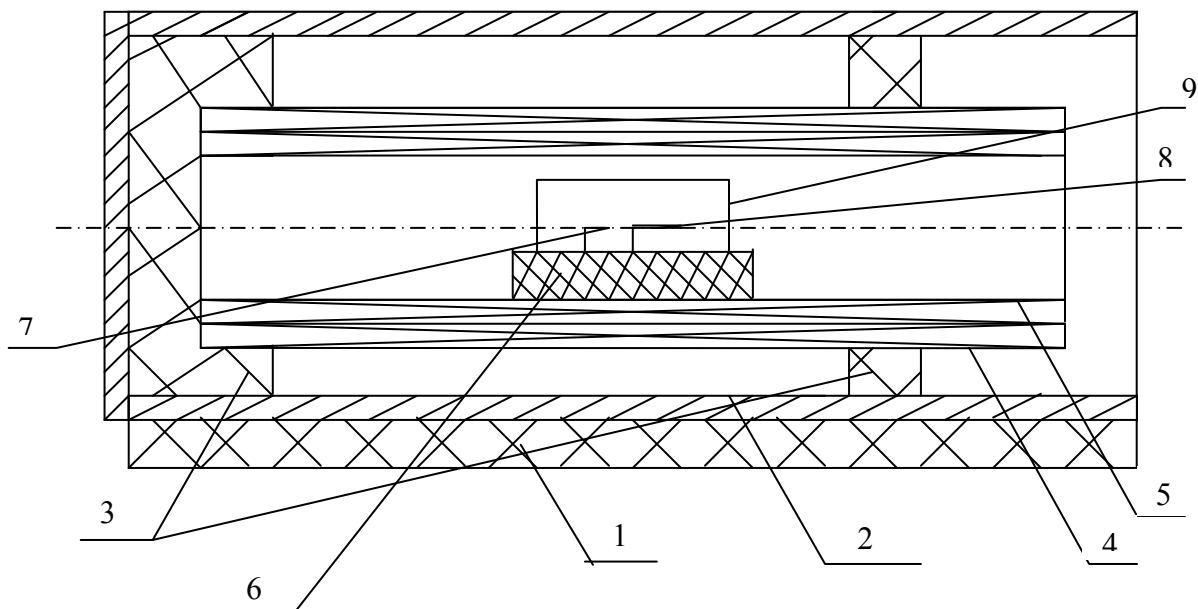


Рис.1. Вид экспериментальной установки в разрезе. 1 – демпфирующая резина; 2 – двухслойный пермалловый экран с дном.; 3 – кольца из немагнитного материала, центрирующие обмотки соленоида относительно центральной оси экрана; 4 и 5 – обмотки соленоида; 6 – подставка из немагнитного материала; 9 – влажная камера; 7 – подставка из немагнитного материала внутри влажной камеры; 8 – корни кресс-салата или кукурузы.



Рис.2. Внешний вид установки сбоку.

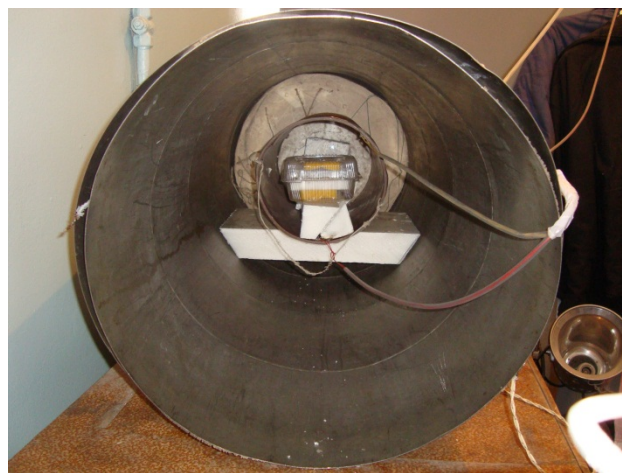


Рис.3. Внешний вид внутренней части установки.

Для наблюдения биологических эффектов комбинированного магнитного поля необходимо, чтобы однородность постоянной составляющей магнитного поля не была менее, чем 1.5 %. Такая однородность в данной конструкции обеспечивается в цилиндре диаметром 60 – 70 мм вокруг оси и вдоль оси на расстоянии лишь 8 – 12 мм. Таким образом, длина корня не должна превышать 8-12 мм, если корни расположены вдоль оси экрана, чтобы он весь находился в области магнитного поля необходимой однородности.

Необходимая однородность магнитного поля определяется шириной резонансной кривой биологического эффекта, которую наблюдали ранее [2,3,6,7]. Обычно она составляет 1.5 -2%.

Т.к. обычно использовалась длина корня порядка 15 мм, необходимо было добавить обмотки на концах

соленоида, которые увеличили область однородности магнитного поля и позволили использовать корни такой длины.

Измерены магнитные шумы пермаллового экрана, расположенного горизонтально с помощью феррозондового магнитометра и анализатора спектра в области частот от 10^{-4} до 100 Гц и с помощью индукционной катушки и узкополосного усилителя У2-8 в области частот от 16 Гц до 100 кГц. Также был измерен коэффициент ослабления магнитного поля и на основе полученных результатов был рассчитан шум электрического поля внутри экрана. Полученные результаты приведены на рис. 4 и 5. и в таблице 1.

Как хорошо видно из рисунков в области частот 5-10 Гц существует 3 пика (около 5 Гц, 8 Гц и 9.5 Гц) и 3 заметных пика при 50, 100 и 150 Гц.

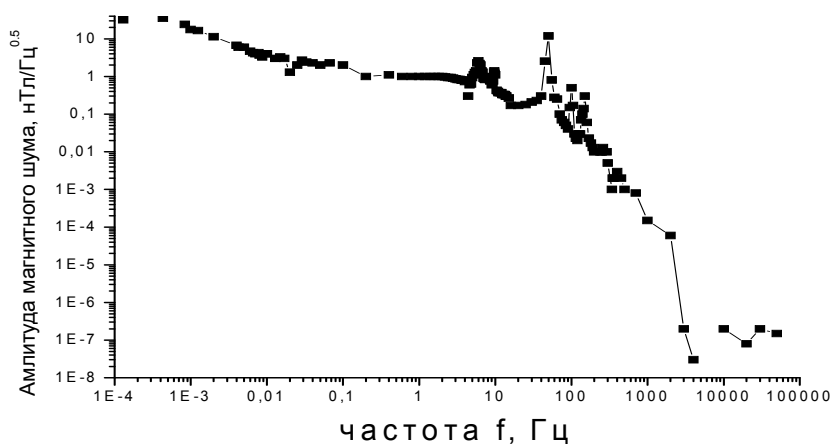


Рис.4. Зависимость амплитуды спектральной плотности магнитного шума от частоты внутри экрана.

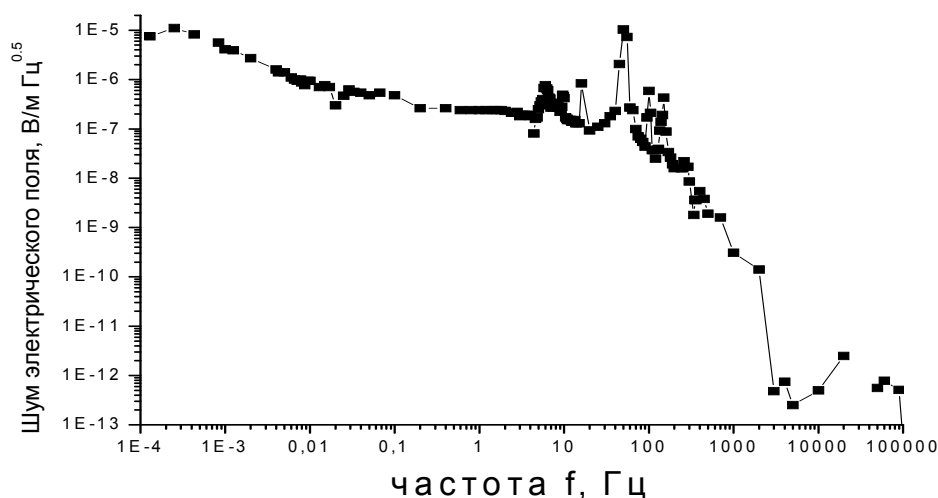


Рис.5. Зависимость амплитуды спектральной плотности шума электрического поля от частоты внутри экрана.

Измерение спектральной плотности магнитного шума в экране проводилось следующим образом. Сначала измеряли величину дрейфа магнитного поля в экране в течение суток с помощью феррозондового магнитометра, соединенного с Фурье анализатором спектра. Это дало кривую в области от 10^{-4} Гц до 100 Гц. Затем с помощью индукционной катушки и узкополосного усилителя У2-8 измеряли магнитный шум вне экрана в области частот 16 Гц – 100 кГц. Полученные значения делили на коэффициент экранирования экрана.

Коэффициент экранирования экрана определяли следующим образом. Весь экран помещали в большой соленоид, в котором создавали большое магнитное поле. Измеряли это поле при отсутствии экрана, а затем при его присутствии внутри экрана. Отношение внешнего магнитного поля к тому, что проникло внутрь экрана и есть коэффициент экранирования. Его значения приведены в таблице 1. Тут необходимо отметить, что величины магнитного шума, полученные этими двумя разными методами в области частот 16 Гц – 100 Гц хорошо согласуются между собой.

Таблица 1

Зависимость продольного $S_{B\parallel}$ и перпендикулярного $S_{B\perp}$ коэффициентов экранирования пермалловым экраном переменного магнитного поля, коэффициента экранирования экраном переменного электрического поля S_E , глубины проникновения переменного магнитного поля в пермаллой 79НМ δ и волнового сопротивления пермаллоя 79НМ $Z_{с\ перем}$ от частоты внешнего поля f .

f , Гц	$S_{B\parallel}$	$S_{B\perp}$	S_E	$\delta \cdot 10^{-4}$, м	$Z_{с\ перем}$, Ом
20	11	34	304698	8.6	9.9×10^{-4}
30	12	36	303539	7.4	1.2×10^{-3}
40	14	38	347010	6.1	1.4×10^{-3}
50	16	46	387300	5.5	1.5×10^{-3}
60	17	51	409875	5.0	1.7×10^{-3}
70	18	56	420745	4.8	1.8×10^{-3}
80	18	57	435091	4.5	2.0×10^{-3}
90	19	58	459493	4.3	2.1×10^{-3}
100	20	58	547052	4.0	2.1×10^{-3}
120	23	61	595520	3.8	2.2×10^{-3}
130	26	64	611720	3.7	2.3×10^{-3}
140	29	67	684135	3.5	2.4×10^{-3}
150	32	70	780935	3.3	2.5×10^{-3}
170	39	75	794910	3.2	2.7×10^{-3}
200	45	80	944055	3.0	2.8×10^{-3}
250	60	100	1022541	2.9	2.9×10^{-3}
350	107	140	1379510	2.6	3.2×10^{-3}
450	168	194	1514295	2.5	3.4×10^{-3}
500	240	240	1583110	2.5	3.4×10^{-3}
550	327	277	1632281	2.4	3.4×10^{-3}
600	375	297	1788928	2.4	3.4×10^{-3}
650	422	315	1813920	2.4	3.4×10^{-3}
1000	1560	920	1892100	2.3	3.8×10^{-3}
2000	2230	3543	2590274	2.1	4.1×10^{-3}
4000	2900	6356	5182931	1.9	4.7×10^{-3}
9000	3437	8546	8790100	1.8	4.8×10^{-3}
10000	3571	9090	1.3×10^7	1.9	4.8×10^{-3}
20000	5913	4760	1.3×10^7	1.5	5.7×10^{-3}
30000	1687	2354	3.3×10^7	1.3	6.2×10^{-3}
40000	1111	1332	3.7×10^7	1.2	6.8×10^{-3}
50000	555	344	5.4×10^7	1.2	7.2×10^{-3}
60000	333	300	1.05×10^8	1.1	7.9×10^{-3}
70000	313	292	1.06×10^8	1.1	8.0×10^{-3}
80000	203	210	1.06×10^8	1.1	8.0×10^{-3}
90000	250	200	1.1×10^8	1.1	7.6×10^{-3}

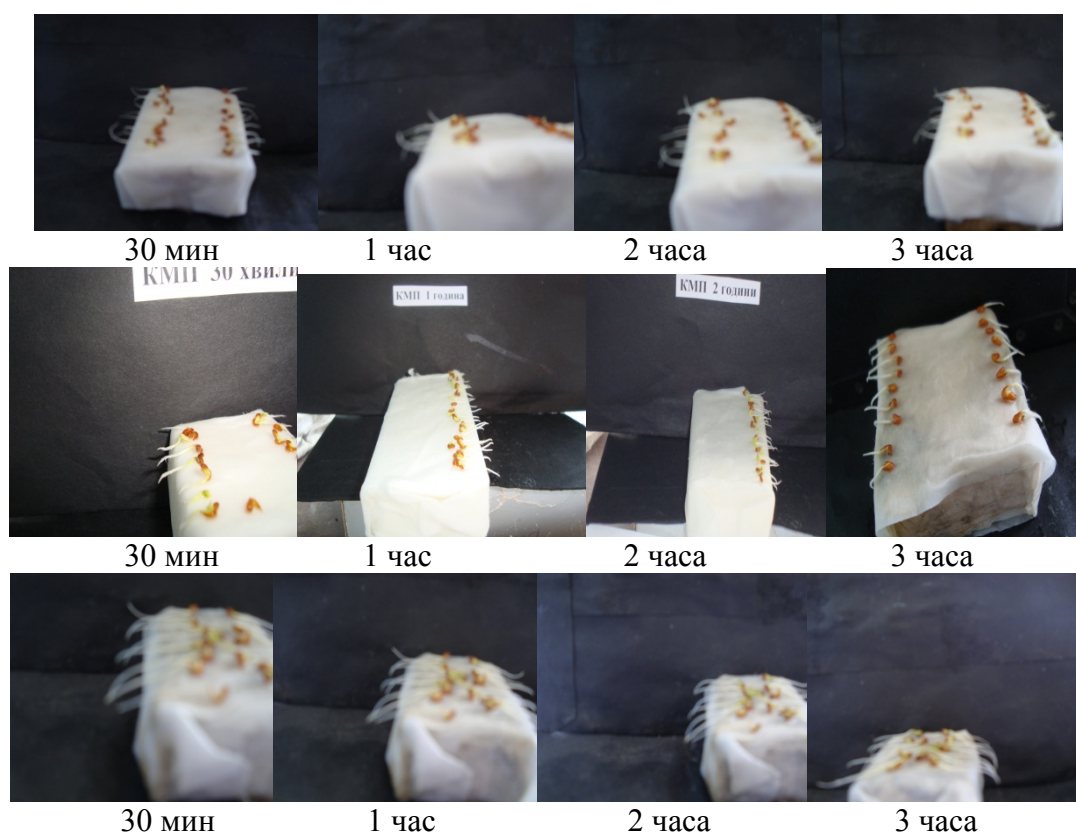


Рис. 6. Гравитропическая реакция корней кресс-салата, расположенных перпендикулярно силе тяжести и направлению КМП (КМП перпендикулярно вектору силы тяжести) – вверху.
 Гравитропическая реакция корней кресс-салата, расположенных перпендикулярно силе тяжести и параллельно направлению КМП (КМП перпендикулярно вектору силы тяжести) – в середине.
 Гравитропическая реакция корней кресс-салата, расположенных перпендикулярно силе тяжести и направлению ПМП (ПМП перпендикулярно вектору силы тяжести) – внизу.

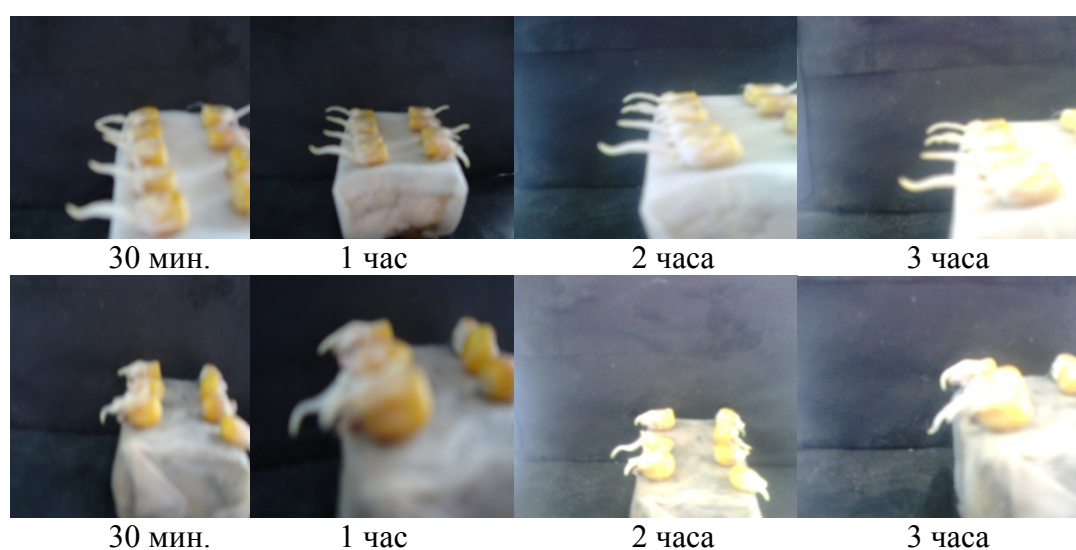


Рис. 7. Гравитропическая реакция корней кукурузы, расположенных перпендикулярно силе тяжести и направлению КМП (КМП параллельно вектору силы тяжести) – вверху.
 Гравитропическая реакция корней кукурузы, расположенных перпендикулярно силе тяжести и параллельно направлению ПМП (ПМП параллельно вектору силы тяжести) – внизу.

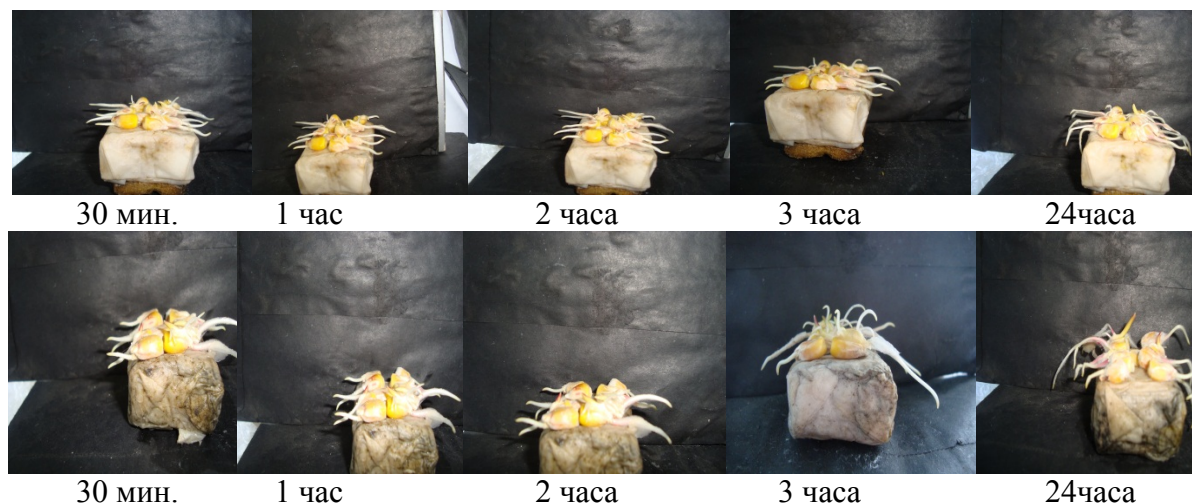


Рис.8. Гравитропическая реакция корней кукурузы, расположенных перпендикулярно силе тяжести и направлению КМП (КМП перпендикулярно вектору силы тяжести) – сверху. Гравитропическая реакция корней кукурузы, расположенных перпендикулярно силе тяжести и параллельно направлению КМП (КМП перпендикулярно вектору силы тяжести) – внизу.

По известной (измеренной непосредственно) спектральной плотности магнитного шума внутри экрана $g_{B\parallel}^{0.5}$, используя известную связь между векторами электрической напряженности $E_{\perp}$ и напряженности $H_{\parallel}$ магнитного поля внутри экрана, была вычислена спектральная плотность шума переменного электрического поля внутри экрана $g_{E\perp}^{0.5}$. Между напряженностью магнитного поля $H_{\parallel}$ и напряженностью электрического поля $E_{\perp}$ связь определяется формулой

$$E_{\perp} = H_{\parallel} (\omega \mu_0 \mu / 2\sigma)^{0.5},$$

где $H_{\parallel}$ – продольная компонента переменного магнитного поля в экране, $E_{\perp}$ – поперечная компонента переменного электрического поля в экране, $\omega = 2\pi f$ – круговая частота магнитного поля, μ_0 – магнитная проницаемость вакуума, μ – относительная магнитная проницаемость пермаллоя, σ – удельная проводимость пермаллоя.

На рис. 5 приведена зависимость расчетного значения амплитуды спектральной плотности шума переменного электрического поля в рабочем объеме пермаллового экрана от частоты. Хорошо видно, что эта зависимость имеет максимумы на тех же частотах, что и зависимость амплитуды спектральной плотности шума переменного магнитного поля (см. рис. 4). На частоте 50 Гц $g_{E\perp}^{0.5}$ максимальна и ее поперечная компонента достигает значения

$$g_{E\perp}^{0.5} = 2.2 \cdot 10^{-5} \text{ В/м Гц}^{0.5}, \text{ а продольная компонента } g_{E\parallel}^{0.5} = 8.3 \cdot 10^{-6} \text{ В/м Гц}^{0.5}.$$

В качестве образцов использовались двухдневные корешки кресс-салата и кукурузы, предварительно выросшие в бидистиллированной воде. Для того, чтобы они были максимально ровными, их проращивали на фильтровальной бумаге на

планшетках. Предварительная ориентация зародышей зерен была направлена вниз, так что корни растут вдоль силы тяжести.

Корни длиной 7-15 мм помещали на подложку из немагнитного материала так, что корни расположены параллельно земной поверхности, т.е. перпендикулярно силе гравитации. Опыты далее проводились в двух вариантах. В первом варианте корни изначально располагались параллельно комбинированному магнитному полю, во втором – перпендикулярно комбинированному магнитному полю. Контрольные образцы располагались точно также относительно магнитного поля, но магнитное поле было постоянным.

Вариант, когда магнитное поле параллельно силе гравитации для корней кресс-салата исследовалось нами очень подробно ранее [1-5, 7]. Аналогичные результаты получены нами и для корней кукурузы в настоящей работе.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты для кресс-салата приведены на рис. 6. Здесь показано 3 случая. КМП во всех случаях направлено параллельно земле, как показано на рис.1. Вектор гравитации во всех случаях направлен перпендикулярно вектору КМП. Корни же направлены либо перпендикулярно КМП (верхний ряд), либо параллельно КМП (центральный ряд), нижний ряд – контрольные образцы, находящиеся в ПМП.

Проведены исследования корней кукурузы в КМП на установке, подробно описанной в работе [3], в этом случае КМП направлено параллельно силе тяжести. Корни направлены параллельно земле, т.е. перпендикулярно КМП и силе тяжести. Полученные результаты представлены на рис. 7 и аналогичны полученным ранее результатам для корней кресс-

салата [1-5], т.е. получена отрицательная гравитропическая реакция для корней кукурузы.

Результаты для корней кукурузы, расположенных параллельно КМП, аналогичны результатам, полученным для корней кресс-салата (рис.6), т.е. получена обычная гравитропическая реакция, как в КМП, так и в ПМП. (рис.8), хотя и немного более слабая.

Если же корни расположены перпендикулярно КМП, то гравитропическая реакция для корней кукурузы практически отсутствует в течение первых 6 часов, хотя при увеличении времени выдержки все же она возникает.

Сравнение полученных углов отклонения от горизонтали для всех начальных направлений корней кукурузы представлено на рис. 9.

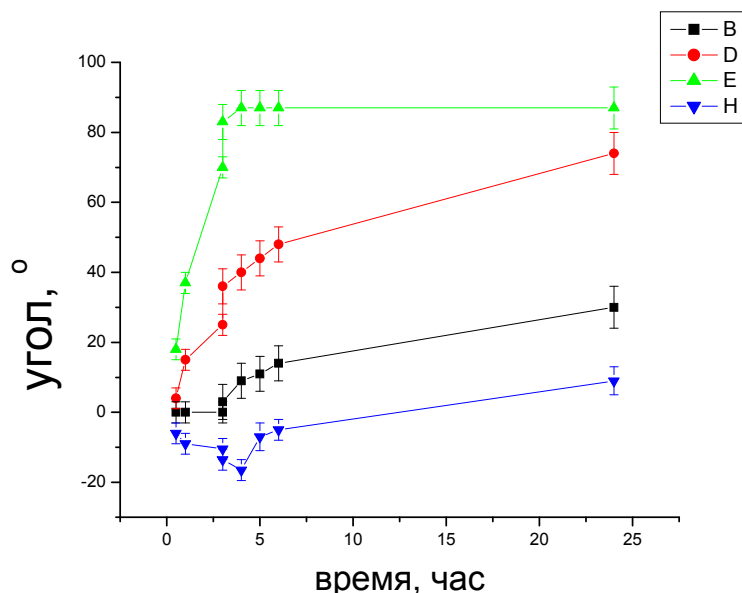


Рис. 9. Зависимость угла отклонения корней кукурузы от горизонтальной плоскости от времени эксперимента: кривая H – корни перпендикулярны КМП, КМП параллельно силе тяжести; кривая B – корни перпендикулярны КМП, КМП перпендикулярно силе тяжести; кривая D – корни параллельны КМП, КМП перпендикулярно силе тяжести; кривая E – контроль в ПМП.

Полученные результаты можно интерпретировать следующим образом. Прежде всего, здесь изложим свое понимание влияния КМП на гравитропическую реакцию растений. Используем гипотезу, высказанную нами в [2], что ГТР связана с давлением тяжелых элементов клетки на ее мембрану в нижней части клетки. А это приводит, в свою очередь, к открытию дополнительных каналов в нижней части клетки и образованию каналов для направленного транспорта ионов. Такое предположение вполне может объяснить ряд наблюдаемых эффектов и в нашем случае. Постоянная составляющая КМП заставляет все ионы (от знака заряда иона зависит только направление вращения) вращаться вокруг поля в ту или другую сторону. Любые столкновения приводят только к изменению радиуса вращения, но не частоты. Вращение связано с возникновением центробежных сил, а, следовательно, оно приводит к увеличению давления на клеточную оболочку. Наложение переменной составляющей МП на постоянную составляющую должно приводить к возникновению колебаний мембраны с частотой, равной частоте переменной составляющей КМП, что может привести к дополнительному открытию каналов в мембране в

области максимального давления и дополнительному направленному транспорту ионов через образовавшиеся каналы. В КМП эти каналы могут быть расположены не только в месте нахождения самых тяжелых частиц в клетке, т.е. внизу, что может привести к изменению направленного транспорта ионов и знака ГТР. Изменение количества каналов приводит к изменению скорости ГТР. Однако резонансное образование новых каналов должно наблюдаться при этом на частотах собственных колебаний мембраны под действием силы тяжести, оценка этих частот дает величину порядка $10^6 - 10^7$ Гц. Оценки давления, оказываемого на стенку мембраны крахмальными зернами, дают величину порядка $(0.3 - 5) \cdot 10^{-5}$ Н/м², аналогичные расчеты для давления, оказываемого на стенку мембраны силой, возникающей в результате вращения ионов в КМП, дают величину того же порядка $(0.1 - 0.5) \cdot 10^{-5}$ Н/м². Т.о. могут образовываться дополнительные каналы в мембране, причем в направлении, перпендикулярном силе гравитации, в нашем случае их образуется больше, т.к. направление силы Лоренца перпендикулярно силе гравитации. Кроме этого, наличие переменной составляющей КМП должно

приводить к осцилляциям давления и растяжения мембраны в направлении, перпендикулярном силе гравитации, что, в свою очередь, должно приводить к осцилляциям размеров ионных каналов и изменению их пропускной способности. Однако образование новых дополнительных каналов в мембране при таком давлении затруднительно, т.к. для этого надо гораздо большее давление. Если же учесть давление оказываемое ионами, находящимися в электрическом поле, на стенку мембраны, то оно будет значительно больше: порядка 10^7 Н/м², а это уже значительное давление. На него дополнительно накладывается давление, связанное с вращением. И даже малые добавки к давлению могут привести к образованию дополнительных каналов в мембране, причем в направлении, перпендикулярном силе гравитации, в нашем случае их образуется больше, т.к. направление силы Лоренца перпендикулярно силе гравитации. Кроме этого, наличие переменной составляющей КМП должно приводить к осцилляциям давления. А это уже может привести к осцилляциям мембраны и ее растяжению в направлении, перпендикулярном силе гравитации, что, в свою очередь, должно приводить к осцилляциям размеров ионных каналов и их пропускной способности. Численная оценка растяжения кальциевых каналов дает величину 10 – 100 нм. Это больше размера канала, равного приблизительно 0.3 - 0.7 нм. Осцилляции мембраны происходят с частотой переменной составляющей КМП. Размер пучка ионов (уширение одного размера) осциллирует с циклотронной частотой. Возможен резонанс этих двух процессов.

Однако резонансные эффекты на циклотронных частотах ионов должны наблюдаться только, если места синтеза ионов в клетке локализованы (вблизи этих мест должно быть максимальное число новых каналов в мембране). Таким образом, сама по себе эта гипотеза, высказанная нами в [2] не может приводить к резонансным эффектам на циклотронных частотах. Она объясняет только эффекты постоянного магнитного поля. Но если ее объединить с гипотезой и расчетами Либова с соавторами [8], то можно сделать очень интересные выводы.

Согласно [8], скорость дрейфа ионов пропорциональна величине электрического поля, времени столкновения ионов, функции Бесселя в квадрате от отношения магнитной индукции переменного магнитного поля к магнитной индукции постоянного магнитного поля, отношению заряда к массе иона.

Уравнение для движения иона в комбинированном магнитном поле B_z и электрическом поле E_x можно записать следующим образом [8]:

$$\begin{aligned} m dv_x/dt + mv_x/\tau &= qE_x + qB_z v_y \\ m dv_y/dt + mv_y/\tau &= -qB_z v_x \\ m dv_z/dt + mv_z/\tau &= 0 \end{aligned} \quad (1)$$

Здесь m – масса иона, v – его скорость, τ – время свободного пробега иона (до столкновения с какими

либо другими частицами). Из этих уравнений ясно, что скорость дрейфа лежит в $x-y$ – плоскости и его можно выразить как $v = v_x + iv_y$. Учитывая, что $B = B_{DC} + B_{AC} \exp i\omega t$ (ω – частота внешнего магнитного поля) получается, что

$$dv/dt + 2\beta v = \Gamma - i\Omega (1 + \varepsilon \cos \omega t) v \quad (2).$$

Здесь $\beta = 1/2 \tau$, $\Omega = qB_{DC}/m$ – циклотронная частота, $\varepsilon = B_{AC}/B_{DC}$, $\Gamma = \Omega E_x/B_{DC}$.

Решение уравнения (2) содержит как члены, которые затухают во времени, так и периодические члены. Оставляя в уравнении члены типа резонансных, получили для скорости v серию функций Бесселя:

$$v = \sum_{n=1}^{\infty} \Gamma J_n(\varepsilon \Omega/\omega) J_n(\varepsilon \Omega/\omega) / (2\beta + i\omega(\Omega/\omega - n)) \quad (3)$$

Для функции Бесселя 1 порядка, т.е. когда $n = 1$ для скорости дрейфа получается выражение

$$v = \Gamma J_1^2(\varepsilon) / 2\beta \quad (4).$$

При отходе от резонанса скорость дрейфа определяется формулой (5)

$$v = \Gamma J_1^2(\varepsilon \Omega/\omega) / [2\beta + (\omega^2/2\beta)(\Omega/\omega - 1)^2] \quad (5).$$

Для $n=1$ имеем $v = qE_x \tau J_1^2(\varepsilon)/m$ (6). Подставляя в (6) численные значения $E_x = 10^6 - 10^7$ В/м, $\tau = 10^{-10}$ сек, получим для кинетической энергии пучка значение в 5-20 раз превышающее тепловую энергию ионов.

Полученные Либовым с соавторами формулы (4, 5) хорошо объясняют полученные эффекты в КМП, но не объясняют ни пороговых эффектов постоянного магнитного поля, ни сужения линии зависимости эффекта от отношения B_{AC}/B_{DC} при малых шумах B_{DC} .

Сравним ее с нашей гипотезой. Оба эти представления могут объяснить полученные нами ранее эффекты [1-5, 7, 9, 10, 11], если их объединить. Первый эффект – это наличие порога воздействия постоянного магнитного поля [9, 10].

Исходя из наших представлений, максимальное давление ионов на мембрану должно получаться в магнитном поле, направленном перпендикулярно потоку основных ионов, участвующих в изучаемом биологическом процессе, что приводит к возникновению новых каналов в направлении, перпендикулярном постоянному магнитному полю и параллельном направлению движения основных ионов либо увеличению их диаметра. Это в свою очередь должно приводить к возникновению пороговых биологических эффектов. С точки зрения формул (4, 5) наличие постоянного магнитного поля приводит к тому, что изменяется время затухания скорости пучка ионов a , следовательно, и к изменению потока ионов через мембрану a , следовательно, и к биологическим эффектам.

Комбинированное магнитное поле приводит, согласно нашим представлениям к колебаниям мембраны в направлении, перпендикулярном магнитному полю с частотой переменной составляющей магнитного поля. Одновременно с циклотронной частотой колеблется радиус пучка

ионов. Когда обе частоты совпадают, резонансно увеличивается поток ионов через мембрану. Это приводит к возникновению биологического эффекта. С точки зрения формул (4,5) резонансно возрастает скорость дрейфа пучка ионов через мембрану.

Различие заключается в том, что Либов с соавторами учитывают большое электрическое поле мембраны и этот факт приводит к тому, что снимается основное возражение теоретиков, заключающееся в том, что энергия магнитного поля много ниже кТ. Учет электрического поля мембраны, которое велико, дает величину в 5-20 раз большую, чем тепловая энергия кТ. Т.е. основная энергия черпается из самой клетки, а комбинированное магнитное поле является спусковым механизмом для его включения.

Т.к. обе эти теории дают существенную зависимость наблюдаемых эффектов от направления движения определенных ионов, то полученные нами результаты можно трактовать следующим образом. Основное направление потока ионов кальция лежит вдоль корня: параллельно направлению его роста.

Здесь следует заметить, что, если основное направление ионов располагается вдоль направления комбинированного магнитного поля, то биологического эффекта не должно быть. Это и наблюдается нами в опыте.

Теперь постараемся объяснить расположение крахмальных зерен, подробно изученное нами в [3] в КМП. Колебания мембраны могут приводить к тому, что крахмальные зерна будут взаимодействовать с мембраной либо механически, либо электрически. Они могут подталкиваться мембраной к центру клетки и даже дальше при колебании мембраны. Затем, если они даже и начнут оседать вниз, то попадут уже в противоположную часть клетки и, следовательно, могут изменить знак гравитропической реакции корня. Кроме того, столкновение крахмальных зерен с потоком ионов кальция должно приводить к возникновению в этих зернах дипольного момента (пьезоэлектрические свойства крахмала), направленного против электрического поля мембраны, что, по-видимому, также приводит к их движению к центру клетки на начальном этапе. В центре их энергия в электрическом поле меньше, т.к. электрическое поле в центре клетки минимально. Двигаясь к центру клетки, часть дипольных моментов начнет поворачиваться и может начать двигаться вверх, что приведет к отрицательной гравитропической реакции для корней. Т.е. в комбинированном магнитном поле гравитропическая реакция должна замедляться, или пропадать, или менять знак, если основной поток ионов направлен перпендикулярно КМП.

Пользуясь оценками Либова и нашими оценками, можно объяснить и зависимости наблюдаемого биологического эффекта от уровня внешнего магнитного шума [2,12,13]. Если уровень внешнего магнитного шума мал (пучок движущихся ионов не захватывает новых каналов из-за размытия ионного

пучка в магнитном поле с индукцией, равной постоянной составляющей КМП), то КМП будет искажать зависимость величины биологического эффекта от отношения V_{AC}/V_{DC} , т.к. захват пучком нового канала будет сказываться резко в увеличении биологического эффекта. Линия этой зависимости будет более узкой, чем квадрат функции Бесселя [2]. При увеличении магнитного шума она будет приближаться к квадрату функции Бесселя первого порядка от V_{AC}/V_{DC} , как и определяется формулой (4). Это также хорошо совпадает с полученными нами ранее зависимостями [13].

Становится понятным также влияние экранирования внешнего магнитного поля на различные биологические процессы. Кроме эффекта, связанного с уменьшением постоянной составляющей, рассмотренного нами выше, существенно должно усилиться влияние внешних магнитных шумов. Например, при компенсации постоянной составляющей внешнего магнитного поля с помощью колец Гельмгольца или обычных ферромагнитных экранов до 10 - 1 мкТл [14, 15] отношение V_{AC}/V_{DC} для внешних магнитных шумов на частоте до 50 Гц равняется приблизительно 0.3 - 3. Следовательно, частоты до 50 Гц могут активно воздействовать на биологические процессы, т.к. большинство резонансных частот (для ионов кальция, магния, калия, меди) лежит в этой области. Магнитные бури при такой постановке эксперимента также являются активными. Поэтому уменьшение постоянной составляющей магнитного поля Земли является крайне нежелательным фактором, который может существенно изменять кальциевый, калиевый, магниевый обмен в клетке. Особенно это важно для ослабленных клеток, мембраны которых могут легко разрываться. Рассмотрим теперь возможный механизм адаптации клеток к влиянию КМП. Как хорошо видно из рис. 9 ГТР постепенно (через 24 часа и далее) начинают восстанавливать свой знак. Увеличение транспорта кальция из клетки могут привести к тому, что концентрация ионов магния внутри клетки возрастает. Т.к. ионы магния являются катализаторами синтеза липидов, то существенно может измениться коэффициент жесткости мембраны. Здесь следует отметить, что циклотронная частота ионов магния в постоянном магнитном поле Земли находится вблизи 50 Гц. (В работах [16, 17, 18] было показано, что в КМП, постоянная составляющая которого равна магнитному полю Земли, а переменную составляющую КМП частотой 50 Гц создавали искусственно с помощью колец Гельмгольца, концентрация полярных липидов в мембране клеток редиса существенно изменялась и при этом изменялась текучесть мембраны.) Таким образом, изменение (уменьшение), коэффициента жесткости мембраны, согласно нашим предположениям, изложенным выше, может привести к уменьшению количества кальциевых каналов, а,

следовательно, и к увеличению концентрации ионов кальция внутри клетки.

ВЫВОДЫ

1. Экспериментально показано, что гравитропическая реакция растений существенно зависит от направления корней относительно комбинированного магнитного поля. При расположении корней перпендикулярно КМП и перпендикулярно силе гравитации (КМП параллельно силе гравитации) наблюдается отрицательная гравитропическая реакция. При расположении корней перпендикулярно КМП и перпендикулярно силе гравитации (КМП перпендикулярно силе гравитации) гравитропическая реакция отсутствует. При расположении корней параллельно КМП и перпендикулярно силе гравитации (КМП перпендикулярно силе гравитации) гравитропическая реакция незначительно изменяется.

2. Полученные в этой работе эффекты и большинство полученных нами ранее результатов хорошо согласуются с гипотезами [2.8]. Пользуясь ими можно утверждать, что основной поток ионов кальция направлен вдоль корней.

3. Существенную роль в наблюдении эффектов играет электрическое поле мембраны клетки. Учет его величины позволяет убрать все возражения теоретиков о невозможности действия магнитного поля, т.к. мала его энергия. МП и КМП являются лишь спусковым механизмом, освобождающим энергию клетки и приводящим к биологическим эффектам..

4. С помощью КМП, таким образом, можно регулировать скорость кальциевого обмена в клетке.

5. Обсуждается возможный механизм адаптации клеток к КМП. Он связывается в нашем представлении с ионами магния.

Литература

- Богатина Н.И., Шейкина Н.В., Кордюм Е.Л., Карачевцев В.А. Гравитропическая реакция растений в комбинированном (постоянном и переменном) магнитном поле // Доповіді НАН України. – 2002. – №4. – С. 176 – 179.
- Шейкина Н.В., Богатина Н.И., Кордюм Е.Л. Влияние комбинированного магнитного поля на гравитропическую реакцию растений и спектр электромагнитного излучения, генерируемого ими в процессе роста // Радиофизика и электроника. – 2005. – Т.10, №2. – С.331 – 335.
- Bogatina N.I., Kordyum E.L., Kalinina Ya. M., Sheykina N.V. A weak combined magnetic field changes root gravitropism // Advances in Space Research (aCOSPAR information). – 2005. – V. 36, №7. – P.1229 – 1236.
- E. Kordyum, N. Bogatina, M. Sobol, Ia. Kalinina, N. Sheykina and A. Kondrachuk Cyclotron-based effects on plant gravitropism // Journal of Advances in Space Research, - 2007. - V 39, №7. - P. 1210 – 1218.
- Е.Л. Кордюм, М.А. Соболев, Я.М. Калинина, Н.И. Богатина, Н.В. Шейкина Биологічна дія комбінованого магнітного поля на гравітропічну реакцію кореня *Lepidium Sativum* L. // Укр. ботан. журн. – 2008. – Т. 65, №1. – С. 141 – 157.
- Леднев В.В. Биоэффекты слабых комбинированных, постоянных и переменных магнитных полей // Биофизика. – 1996. – 41. – Вып. 1. – С. 224 – 232.
- Шейкина Н.В., Богатина Н.И., Кордюм Е.Л. Зависимость гравитропической реакции кресс-салата от амплитуды переменной составляющей комбинированного магнитного поля // Біофізичний Вісник (Вісник Харківського університету). – 2007 – №18(1) - С. 78 – 90.
- G.Vincze, A.Szasz, A.R. Liboff. New theoretical treatment of ion resonance phenomena // Bioelectromagnetics. – 2010 – V.29- P.380-386.
- Богатина Н.И., Шейкина Н.В., Кордюм Е.Л. Изменения гравитропической реакции, вызванные постоянным магнитным полем. // Біофізичний вісник. 2006. - №17(1). – С. 78 – 82.
- Богатина Н.И., Веркин Б.И., Кулабухов В.М. др. Определение порога чувствительности проростков и корней пшеницы к величине магнитного поля // Физиология растений – 1979 – 28 - №3 - С.620-624.
- Богатина Н.И., Веркин Б.И. Влияние слабых магнитных полей на скорость роста, сухую массу и скорость клеточной репродукции гороха // Доклады АН УССР, - серия Б – 1979 - №6 - С.460-463.
- Богатина Н.И., Литвин В.М., Травкин М.П. Зависимость реакции биологических объектов на магнитные поля от их шумов (полей), возможное влияние на процессы эволюции // Электронная обработка материалов. – 1987. – №4. – С. 64 – 69.
- Шейкина Н.В., Бондаренко В.А., Богатина Н.И. Влияние внешних магнитных шумов на гравитропическую реакцию растений и на амплитуду и спектр генерируемого ими в процессе роста магнитного шума. // Біофізичний вісник. 2008. - №20(1). – С. 96 – 102.
- Демидун Н.А., Махонина М.М., Темурьянц Н.А., Мартынюк В.С. Влияние электромагнитного экранирования различной продолжительности на регенерацию планарий *Dugesia Tigrina*. // Физика живого Т.16. №1, 2008, С.68-73.
- Темурьянц Н.А., Демидун Н.А., Мартынюк В.С. Особенности регенерации планарий *Dugesia Tigrina* при их электромагнитном экранировании в различные сезоны года. // Физика живого Т.16. №2, 2008, С.89-91.
- Новицкая Г.В., Церенова О.А., Кочешкова Т.К., Новицкий Ю.И. Влияние переменного магнитного поля на состав и содержание липидов в проростках редиса. // Физиология растений. Т.53. №1. 2006. С.83-93.
- Новицкая Г.В., Церенова О.А., Кочешкова Т.К., Юсупова И.У., Новицкий Ю.И. Влияние переменного магнитного поля на состав и содержание липидов семядольных листьев редиса. Центрально-Черноземное книжное издательство. Выпуск 8. Воронеж, 2006. С.23-33.
- Nedukha O., Kordyum E., Bogatina N., Sobol M., Vorobyeva T., Ovcharenko Y. The influence of combined magnetic field on the fusion of plant protoplasts // J Grav. Physiol. 2007 Jul;14(1):P117-8.

ВПЛИВ ОРІЄНТАЦІЇ КОРЕНІВ ВІДНОСНО КОМБІНОВАНОГО МАГНІТНОГО ПОЛЯ НА ЗМІНИ ГРАВИТРОПІЧНОЇ РЕАКЦІЇ КОРЕНІВ КРЕС-САЛАТУ ТА КУКУРУДЗИ. ЕКСПЕРИМЕНТ ТА НОВА ГІПОТЕЗА, МЕХАНІЗМИ АДАПТАЦІЇ**Богатіна Н.І., Шейкіна Н.В., Кордюм Е.Л.**

Експериментально показано, що гравітропічна реакція рослин залежить від напрямку коренів щодо комбінованого магнітного поля (КМП). При розташуванні коренів перпендикулярно КМП гравітропіческа реакція коренів змінюється: стає або позитивною, або взагалі відсутня. Якщо ж коріння розташовані паралельно КМП, то гравітропіческа реакція якісно така ж, як і в контролі (постійному магнітному полі ПМП). Ці ефекти і раніше отримані результати добре узгоджуються з гіпотезою Лібова про необхідність врахування електричного поля мембрани і нашою моделлю, яка була змінена (було враховано електричне поле мембрани). Ця модель дозволила пояснити вплив як КМП, так і ПМП. Користуючись нею можна стверджувати, що основний потік іонів Ca^{2+} спрямований вздовж коренів. Основну роль відіграє електричне поле мембрани клітини. Облік його величини дозволяє прибрати всі заперечення про неможливість дії КМП, т.к. мала його енергія. КМП є спусковим механізмом, що звільняє енергію клітини. За допомогою КМП, можна регулювати швидкість кальцієвого обміну в клітині. Обговорюється можливий механізм адаптації клітин до КМП.

Ключові слова: комбіноване магнітне поле, гравітропіческа реакція коренів, крес-салат, кукурудза.

INFLUENCE OF ROOTS ORIENTATION RELATIVELY COMBINED MAGNETIC FIELD DIRECTION ON THE CRESS AND MAIZE ROOTS GRAVITROPIC REACTION'S CHANGES EXPERIMENT AND NEW HYPOTHESIS. ADAPTATION MECHANISM**Bogatina N.I., Sheykina N.V., Kordyum E.L.**

It was shown experimentally that the gravitropic reaction of plants depended on the roots direction relatively to combined magnetic field (CMF) direction. While the roots were located $\perp$ to gravitation force (CMF was $\parallel$ to gravitation force) the negative gravitropic reaction was observed. While the roots were located $\perp$ to CMF (CMF was $\perp$ to gravitation force) the gravitropic reaction was absent. . While the roots were located $\parallel$ to CMF and $\perp$ gravitation force (CMF was $\perp$ to gravitation force) the gravitropic reaction didn't change. The effects obtained in the work may be explained by Liboff's and our hypotheses. By using them we can conclude that the main Ca^{2+} current was directed along the roots. The essential role in observing the effects played the electrical field of cell membrane. By taking in account the magnitude of the electrical field we could get over all theoretic objections that the effects of magnetic fields observed were impossible because its energy was very small. We think that CMF was only the switching on mechanism, which released the cell energy. By means of CMF one may regulate the calcium exchange velocity in cell. The possible mechanism of cell adaptation in CMF was discussed.

Key words: combined magnetic field, gravitropic response of roots, cress and maize.



УДК 597.551.2-131:577.3+621.384

ВПЛИВ ВИПРОМІНЮВАННЯ СИНЬОГО ТА ЗЕЛЕНОГО СПЕКТРА НА ПРОЦЕСИ ЛІПОПЕРОКСИДАЦІЇ ЗАРОДКІВ В'ЮНА

Семочко О.М., Мандзинець С.М., Бура М.В., Санагурський Д.І., Ференсович Я.П.

Львівський національний університет імені Івана Франка, Львів, Україна

e-mail: mcelevyh@yahoo.com

Надійшла до редакції 10.07.2011

Досліджено вплив монохроматичного синього ($\lambda = 460$ нм) та зеленого світла ($\lambda = 530$ нм) на інтенсивність процесів ліпопероксидації, зокрема, утворення ТБК позитивних продуктів перекисного окиснення ліпідів зародків в'юна (*Misgurnus fossilis* L.). Встановлено, що використання опромінення зумовлюють дозозалежне зростання вмісту малонового діальдегіду, що вказує на інтенсифікацію ПОЛ на ранніх етапах розвитку зародків. Низькі дози опромінення не спричиняють достовірних змін процесів вільнорадикального окиснення, а на стадії 10 поділу бластомерів зародків в'юна спостерігали адаптаційні процеси у зародків у відповідь на дію монохроматичного випромінювання.

Ключові слова: зародки в'юна, поділ бластомерів, синє та зелене світло, монохроматичне випромінювання, світлодіоди, перекисне окиснення.

ВСТУП

На сьогодні відома значна кількість експериментальних даних про вплив електромагнітного випромінювання (ЕМВ) видимого спектру на метаболічні системи живої клітини. Це сприяло широкому застосуванню світла у багатьох галузях медицини. ЕМВ застосовують для лабораторної діагностики і профілактики, а також з метою лікування різноманітних захворювань [1]. Про лікувальні властивості світла згадують за умов, коли захворювання не піддається лікуванню традиційними медичними засобами, або коли на відповідні медикаменти організм реагує алергічними реакціями. У педіатрії часто вдаються до різних типів фототерапії, починаючи з неонатального періоду, коли виникає проблема жовтяниці, внаслідок накопичення білірубину – застосовують опромінення синім світлом [2]. Різні типи ультрафіолетового випромінювання застосовують для стабілізації запальних та аутоімунних станів у дитячому віці [3]. Такі можливості застосування світла стимулювали створення потужних світлодіодів, які склали високу конкуренцію лазерам за багатьма показниками, і дали змогу використовувати їх у фототерапії. Зокрема, відомо, що опромінення синім світлом дає позитивний та тривалий результат при лікуванні атипічного дерматиту [4]. Здатність зеленого світла впливати на гідродинаміку очей, понижувати очний тиск – застосовують з метою лікування глаукоми очей [5]. Позитивні результати виявлені після застосування лазерного діоду в якості ад'ювантної терапії пародонтиту [6], застосування такого випромінювання ($\lambda = 660$ нм) веде до зниження бактеріального пулу, і сприяє кращому лікуванню

даного захворювання. Аналогічний ефект, після зміни фотосенсибілізатора, виявляють діоди з іншим типом світла ($\lambda = 810$ нм) [7].

Однак існує велика кількість публікацій, які вказують на протилежні ефекти світла. Цікавою є концепція дії монохроматичного випромінювання на клітину внаслідок резонансної взаємодії світла з біологічним об'єктом на молекулярному рівні [8, 9]. Також вчені вважають, що дія ЕМВ проявляється внаслідок залучення у процес клітинної відповіді окисно-відновних систем організму [4]. Зокрема, синє світло здатне індукувати збільшення вільних радикалів у клітинах епітелію, що може викликати окисний стрес та здійснювати пошкодження мітохондріальної ДНК [10]. Тривале опромінення світлом синього діапазону може викликати руйнування мітохондрій [11]. Проте ці механізми впливу є ще не достатньо вивченими, також невідомі всі можливі мішені, як клітинні, так молекулярні, впливу світла синього та зеленого спектра на організм, зокрема на ембріональні клітини. Тому мета роботи полягала у вивченні впливу ЕМВ синього та зеленого спектра на мембранопов'язані процеси в'юна *Misgurnus fossilis* L. упродовж ембріонального розвитку.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Дослідження проводили на зародках в'юна (*Misgurnus fossilis* L.) через 60, 150, 210, 270 та 330 хв після запліднення яйцеклітин під час стадій, які відповідають стадії 2, 16, 64 бластомерів, восьмому та десятому поділу бластомерів.

Яйцеклітини одержували і запліднювали за методом А.А. Нейфаха [12]. Овуляцію стимулювали внутрішньом'язовим введенням самкам хоріонічного

гонадотропіну (500 од.). Ікру одержану через 36 год після стимуляції, запліднювали у чашках Петрі суспензією спермій, отриману з сім'яників після декапітації та розтину черевної порожнини самців. Через 5-10 хв після запліднення зиготи відмивали та інкубували у фізіологічному розчині Гольтфрета при температурі 20-22°С.

Отримані зиготи піддавали опроміненню синім світлодіодом «AVAGO» ASMT M BOO - NAE00 PBF ($\lambda = 460$ нм) та зеленим ($\lambda = 530$ нм) потужністю 1 Вт з рефлектором «Fraen» – FC-M2-XR79-OR для фокусування випромінювання у площині. Зародки в'юна в умовах контролю та дослідів інкубували у фізіологічному розчині Гольтфрета; в умовах дослідів – опромінювали одноразово одразу після запліднення протягом 1, 5, 10 та 20 хв з відбором клітин на досліджуваних стадіях. Стадії розвитку зародків контролювали візуально під бінокулярним мікроскопом МБС-9.

Інтенсивність процесів ПОЛ аналізували за зміною кількості МДА, визначали за методом Тимирбулатова [13]. Принцип методу базується на активації ПОЛ іонами двохвалентного заліза до рівня, який реєструється спектрофотометрично. При високій температурі у кислому середовищі МДА реагує з тіобарбітуровою кислотою, утворюючи забарвлений триметиновий комплекс з $\lambda_{\text{max}} = 532$ нм [13].

У дослідженнях використовували реактиви вітчизняного виробництва кваліфікації х.ч., Достовірність змін встановлювали за t-критерієм Стьюдента [14].

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Видиме світло здатне змінювати функціональний стан ключових метаболічних систем організму [15], зокрема система антиоксидантного захисту [16, 17] та процеси ПОЛ [18, 19]. Вважають, що мішенями червоного світла у клітині виступають молекули кисню та каталаза [11]. Зелене світло здатне змінювати електропровідність тканин та активувати процеси метаболізму [11]. Можливими фотоакцепторами світла синього діапазону спектра є флавіни (НАДН-дегідрогенази, сукцинатдегідрогенази, ацил-КоА-дегідрогенази), порфіриновмісні сполуки (білірубін, гемоглобін), а також цитохроми, наявність у складі котрих залізовмісних порфіринових простетичних груп і визначає їх здатність поглинати синє світло [11]. Останні дані дають змогу стверджувати, що до ефектів біологічної дії світла причетні також NO-залежні регуляторні системи [20, 21], саме NO є модулятором активності цитохром с-оксидази. Виявлено, що за впливу низькоінтенсивного видимого випромінювання змінюється концентрація АТФ [22], активність Na^+ , K^+ -АТФази [10, 31], деполяризація мембрани та кількість вільних радикалів [10]. Синє та червоне світло здатні виявляти стимулюючу або інгібувальну дію, залежно від дози, на ембріональний розвиток

перепела японського [23, 24]. Опромінення ембріонів перепела веде до зростання ТБК-позитивних пероксидних ліпідних продуктів у їх печінці [25].

Встановлено, що за нормальних умов, інтенсивність процесів вільнорадикального окиснення зародків в'юна *Misgurnus fossilis* L зростає одразу після запліднення, і поступово знижується, протягом синхронних поділів, досягаючи мінімального значення на стадії 8 поділу. На стадії 10 поділу бластомерів інтенсивність процесів ПОЛ зростає [26, 27, 28].

Аналізуючи зміну кількості ТБК позитивних продуктів ПОЛ виявлено, що опромінення синім, а також зеленим світлом зародків в'юна одразу після запліднення (*in vivo*) протягом 1÷20 хв викликає дозозалежне зростання інтенсивності процесів вільнорадикального окиснення на стадії 2 бластомерів. Світло синього спектра тривалістю 1 хв не спричинює істотних змін вмісту перекисних ліпідних сполук на стадії 2 бластомерів порівняно з відповідним показником у контролі. Подібний ефект спостерігали і за опромінення зеленим світлом такої ж тривалості (див. рис 1.). Збільшення експозиції синім світлом зародків до 5 хв призвело до зниження вмісту МДА на $3,5 \pm 0,04$ %, тоді як опромінення зеленим світлом такої ж тривалості веде до інтенсифікації процесів ліпопероксидації на $8,0 \pm 0,19$ % порівняно з контролем. За дії зеленого світла тривалістю 10 хв на стадії 2 бластомерів (рис. 1) вміст МДА достовірно зростав на $10,0 \pm 0,03$ %, і становив $1,33 \pm 0,01$ мкмоль/мг білка у порівнянні його вмістом у контролі. Вагоме достовірне зростання кількості ТБК-позитивних продуктів спостерігали за збільшення експозиції зеленого діапазону спектру до 20 хв, яке відповідно становило $1,4 \pm 0,01$ мкмоль/мг білка.

Дія світла синього спектра протягом 20 хв, викликала менш істотне зростання вмісту МДА на $5,0 \pm 0,05$ % у порівнянні із опроміненням зеленим світлом. Можна стверджувати, що зелене світло у більшій мірі інтенсифікує процеси ПОЛ, про що свідчить зростання кількості МДА, проте у порівнянні із дією синього світла, ця різниця є не статистично достовірною. Коротка експозиція (1 хв) веде до не достовірної активації процесів ліпопероксидації у зародках в'юна на стадії 2 бластомерів. Ці дані корелюють із результатами отриманими у ході дослідження впливу низькоінтенсивного видимого світла на соматогенез птиці - низькі дози опромінення синім і червоним світлом не викликають достовірних змін ембріонального розвитку перепела японського [23].

Інтенсивність вільнорадикальних реакцій за вмістом МДА зародків в'юна на стадії 64 бластомерів у контролі становить $0,87 \pm 0,02$ мкмоль/мг білка, тоді як після опромінення даний показник достовірно ($p < 0,001$) зростає на всіх досліджуваних етапах, лише дія синього світла тривалістю 1 хв не викликає достовірних змін кількості МДА (рис. 3). Максимальних значень інтенсивність ПОЛ досягає за

20-хвилинної експозиції світла зеленого діапазону експозиції і становить $1,36 \pm 0,01$ мкмоль/мг білка (рис. 3), тобто інтенсивність процесів ліпопероксидації зростає на $54,2 \pm 0,17\%$ у порівнянні з контролем. Синє світло такої ж тривалості викликає інтенсифікацію

процесів ПОЛ на $38,2 \pm 0,3\%$ і становить відповідно $1,21 \pm 0,01$ мкмоль/мг білка ($p < 0,001$). На стадії 64 бластомерів зелене світло більш істотно впливає на зростання інтенсивності вільнорадикальних процесів зародків, ніж синє світло.

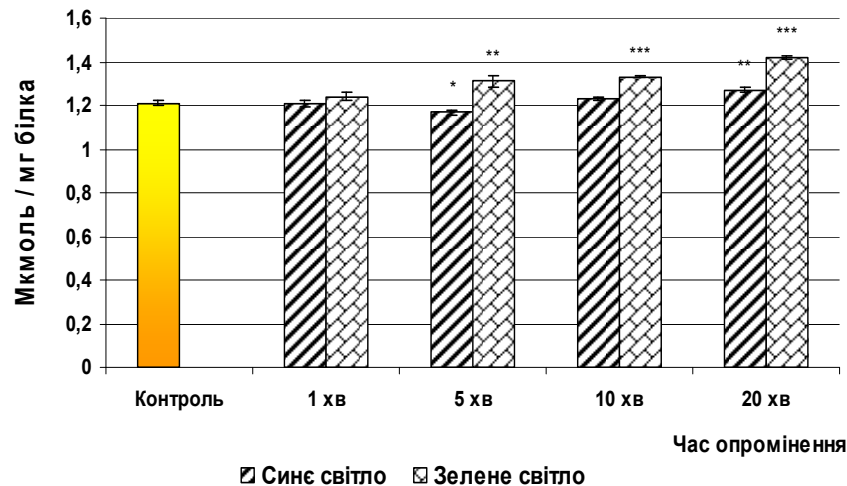


Рис 1. Інтенсивність процесів ПОЛ зародків в'юна на стадії 2 бластомерів за умов впливу синього і зеленого світла різної експозиції. Тут і далі вірогідні зміни порівняно із контролем: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$.

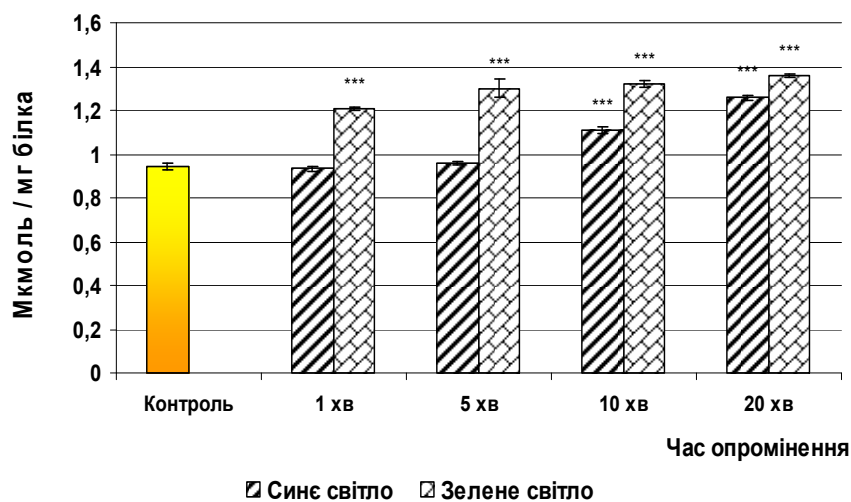


Рис 2. Інтенсивність процесів ПОЛ зародків в'юна на стадії 16 бластомерів за умов впливу синього і зеленого світла різної експозиції.

Подібну закономірність змін інтенсивності процесів ПОЛ відмічено і на стадії восьмого поділу бластомерів. Після опромінення світлом зеленого діапазону упродовж 1 хв (рис. 4) кількість ТБК-позитивних продуктів достовірно зросла на $43,1 \pm 0,58\%$ ($p < 0,001$), й рівень ПОЛ становила $1,2 \pm 0,02$ мкмоль МДА/мг білка.

Світло синього спектру, за подібних умов, а також при збільшенні експозиції до 5 хв, достовірних змін кількості вторинних продуктів процесів ПОЛ не зумовлювало. Лише збільшення тривалості

опромінення синім світлом до 10 та 20 хв ($p < 0,001$) сприяє достовірній активації вільнорадикальних процесів мембран зародків в'юна, про що свідчить зростання вмісту МДА на $31,1 \pm 0,34$ та $49,2 \pm 0,5\%$ відповідно. Максимального рівня кількість МДА досягла на стадії восьмого поділу бластомерів за дії зеленого світла тривалістю 20 хв і становила $1,36 \pm 0,01$ мкмоль/мг білка, що на $62,1 \pm 0,34\%$ більше ніж у контролі. За дії зеленого світла протягом 10 хв інтенсивність процесів ліпопероксидації зародків зросла на $57,1 \pm 0,47\%$ у порівнянні з контролем.

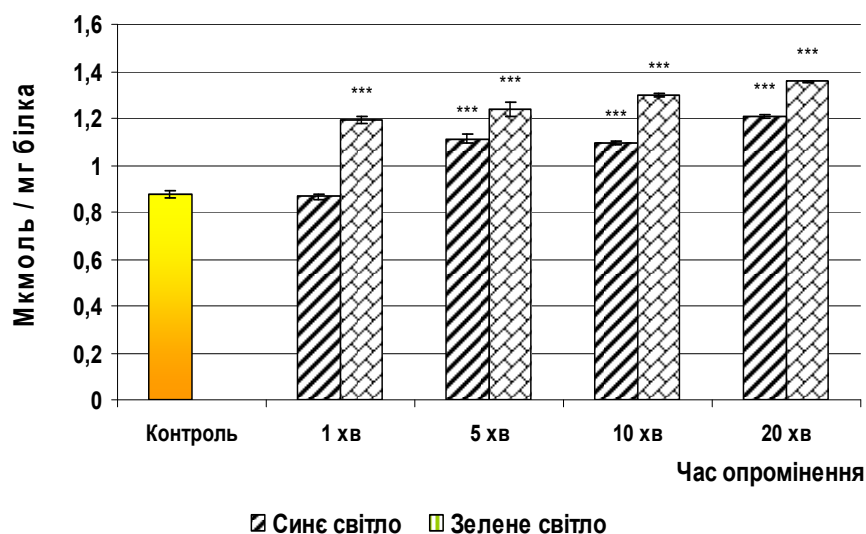


Рис 3. Інтенсивність процесів ПОЛ зародків в'юна на стадії 64 бластомерів за умов впливу синього і зеленого світла різної експозиції.

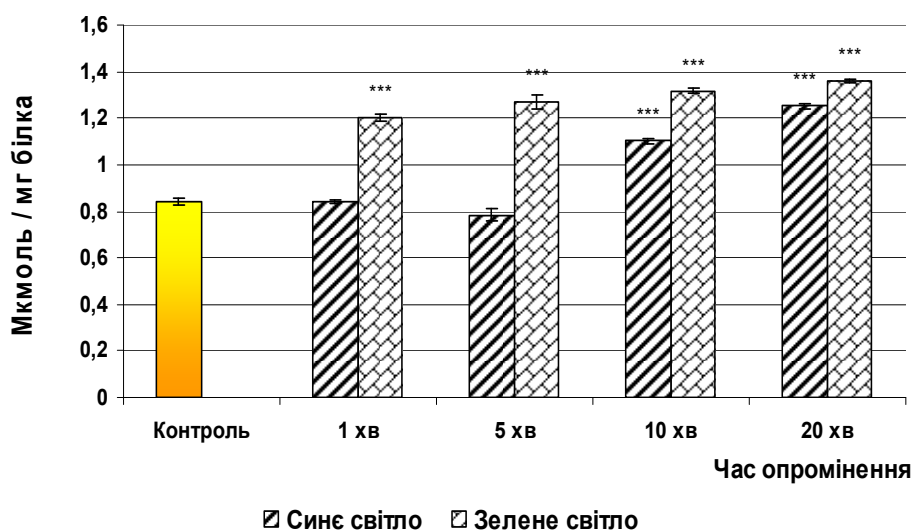


Рис 4. Інтенсивність процесів ПОЛ зародків в'юна на стадії 8 поділу бластомерів за умов впливу синього і зеленого світла різної експозиції.

На стадії 10 поділу бластомерів синє світло активує у значній мірі процеси ПОЛ, ніж зелене світло (рис. 5). За тривалості опромінення 5 хв світло синього діапазону викликало збільшення кількості МДА, відповідно зростала інтенсивність процесів ліпопероксидації на $17,1 \pm 0,32$ % ($p < 0,001$), тоді як зелене лише на $9,2 \pm 0,22$ % ($p < 0,05$) порівняно з контролем, де кількість ТБК-позитивних продуктів становить $1,17 \pm 0,02$ мкмоль/мг білка. Інтенсивність процесів ліпопероксидації є максимальною за дії синього світла тривалістю 20 хв, і досягає рівня $1,41 \pm 0,01$ мкмоль/мг білка, що на $20,2 \pm 0,13$ % більше ніж у контролі. За дії зеленого світла досліджуваний показник зародків в'юна не змінювався і становив $1,4 \pm 0,007$ мкмоль/мг білка. За дії світла синього і зеленого спектру тривалістю 1 хв достовірної активації процесів перекисного окиснення ліпідів на стадії 10 поділу не виявлено.

Встановлено, що опромінення низькоінтенсивним монохроматичним світлом зумовлює надмірне утворення ТБК-позитивних продуктів у зародках в'юна. Процеси вільнорадикального окиснення поступово активуються упродовж раннього розвитку, досягаючи максимальних значень на стадії 8 поділу й істотно знижуються на стадії 10 поділу бластомерів.

Це вказує на запуск репараційних процесів в клітині, і підтверджує той факт, що дія видимого випромінювання на клітину опосередковується запуском процесів ПОЛ. Отримані результати корелюють із твердженням авторів, що енергія поглинутого світла, здатна викликати потік електронів, що, в свою чергу, веде до активації окисно-відновних реакцій, зміни поглинання кисню, електропровідності та виділення вуглекислоти [11]. Під час темної стадії окисного процесу, за участю ферментних систем інтенсивність обмінних процесів

сповільнюється [11], саме зниження процесів ліпопероксидації спостерігалось на стадії 10 поділу бластомерів зародків в'юна, за впливу світла синього та зеленого діапазону. Зростання вмісту МДА може призводити в свою чергу до змін структури мембрани, на користь цього твердження вказують отримані результати при дослідженні співвідношення відсоткового складу ненасичених й насичених жирних кислот клітинних ліпідів мікроскопічних грибів [29], після їх опромінення різними типами низькоінтенсивного випромінювання. Саме ненасичені жирні кислоти беруть участь в регулюванні проникності мембран та функціонуванні

мембранопов'язаних ферментів [29, 30]. Ці дані підтверджуються попередніми дослідженнями, у ході котрих виявлено, суттєві зміни активності Na^+ , K^+ -АТФази зародків в'юна за умов впливу низькоінтенсивного синього та зеленого випромінювання [31]. Цікавими у цьому аспекті будуть результати, що вказують на зв'язок між процесами ліпопероксидації та активністю Na^+ , K^+ -АТФази [32], можна припустити, що наявність такого зв'язку у зародках в'юна, у великій мірі визначає ефекти впливу монохроматичного світлового випромінювання.

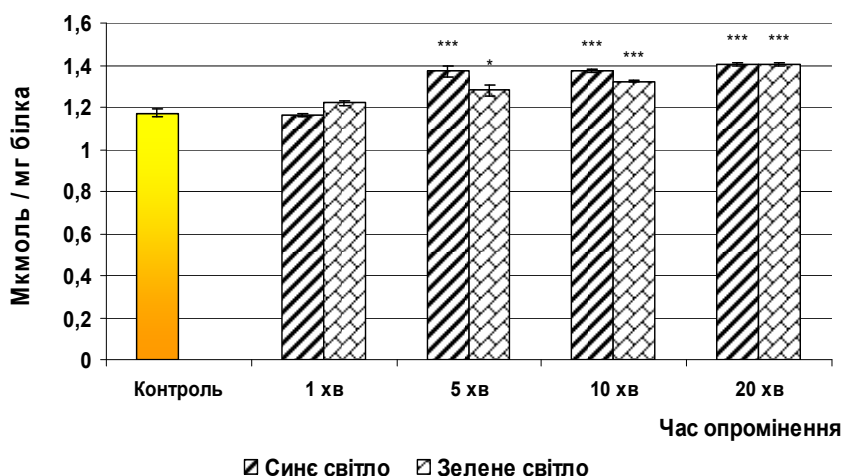


Рис 5. Інтенсивність процесів ПОЛ зародків в'юна на стадії 10 поділу бластомерів за умов впливу синього і зеленого світла різної експозиції.

ВИСНОВКИ

Отримані результати щодо вмісту ТБК-позитивних продуктів у зародках в'юна опромінених синім та зеленим світлом *in vivo*, вказують на перебіг адаптаційних процесів та можливо меншу чутливість досліджуваного об'єкта до дії світлового подразника тривалістю 1 хв. Синє світло тривалістю дії 5 хв істотно впливає на активацію процесів вільнорадикального окиснення ліпідів на стадіях 64 бластомерів та 10 поділу, що зумовлене тісним зв'язком із внутрішньоклітинними процесами, які відбуваються у зародках на даних етапах розвитку. Зокрема на стадії бластули (64 бластомери) зародкові клітини розміщуються моношар, утворюючи високу шапочку. А на стадії 10 поділу бластомерів починається процес гастрюляції. Ядра вже діляться асинхронно, продовжується синтез РНК [25]. Ці процеси у поєднанні зі змінами, що викликає світло синього діапазону і спричиняють на нашу думку таке суттєве підвищення кількості МДА на відповідних етапах розвитку в'юна.

Встановлено, що монохроматичне випромінювання виявляє частото- та дозозалежний вплив на інтенсивність процесів ліпопероксидації на ранніх етапах ембріогенезу в'юна. Отримані дані дозволяють стверджувати, що світло синього та

зеленого спектру може виступати регулятором рівня метаболізму зародків в'юна у ранньому ембріогенезі.

Література

1. Гуляр С. А. Современное состояние ПАЙЛЕР-светотерапии аппаратами Биоптрон. Обзор. / С. А. Гуляр // Фотобиология та фотомедицина. – 2009. – № 4. – С.23 – 35.
2. Prospective randomized controlled study comparing low-cost LED and conventional phototherapy for treatment of neonatal hyperbilirubinemia / V. J. Colindres, C. Rountree, M. A. Destarac [et al.] // Trop Pediatr. – 2011. – Vol. , № . – P. – .
3. Veith W. Medical phototherapy in childhood skin diseases / W. Veith, V. Deleo, N. Silverberg // Minerva Pediatr. – 2011. – Vol. 63, № 4. – P. 327 – 333.
4. Clinical efficacy of blue light full body irradiation as treatment option for severe atopic dermatitis / Detlef Becker, E. Langer, M. Seemann // 2011. Vol. , № . – P. – .
5. Сергиенко Р.М. Перспективы в лечении глаукомы / Р. М. Сергиенко, И.В. Шаргородская //Український медичний часопис. – 2002. – Т. 27, № 1. – С.148 – 152.
6. Histomorphometric and microbiological assessment of photodynamic therapy as an adjuvant treatment for periodontitis: a short-term evaluation of inflammatory periodontal conditions and bacterial reduction in a rat model / R. A. Prates, A. M. Yamada, L. C. Suzuki [et al.] // Photomed. Laser Surg. – 2011. – Vol. , № . – P. – .
7. Boehm T. K. Diode laser activated indocyanine green selectively kills bacteria / T. K. Boehm, S. G. Ciancio // J Int. Acad. Periodontol. – 2011. – Vol. 13, № 2. – P. 58 – 63.

8. Karu T. I. Photobiology of low-power laser therapy / T. I. Karu. – London.: Harwood, Acad. Publ. – 1989.
9. Вплив низької інтенсивності лазерного випромінювання на біологічні об'єкти та чутливість мікроорганізмів до антибактеріальних препаратів / В.В. Пантьо, В.І. Ніколайчук, В.І. Пантьо, А.В. Корунець // Фотобіологія і фотомедицина. – 2010. – № 1-2. – С. 80–87.
10. Blue Light Induces Mitochondrial DNA Damage and Free Radical Production in Epithelial Cells / B.F. Godley, F.A. Shamsi, F-Qi Liang [et al.] // The Journal of Biological Chemistry. – 2005. – Vol. 280, № 3. – P. 21061–21066.
11. Буйлин В.А. Светолазерная терапия. Руководство для врачей. / В.А. Буйлин, А.И. Ларюшин, М.В. Никитина. М. – «Триада» - 2004. – 255 с.
12. Нейфах А.А. Проблемы регуляции в молекулярной биологии развития / А. А. Нейфах, М. Я. Тимофеева. – М.: Наука. – 1978. – 336 с.
13. Тимирбулатов Р.А. Метод повышения интенсивности свободнорадикального окисления липидосодержащих компонентов крови и его диагностическое значение / Р.А. Тимирбулатов, Е.И. Селезнев // Лаб. Дело. – 1981. – № 4. – С. 209–211.
14. Математичні методи в біології: теоретичні відомості, програмований практикум, комп'ютерні тести / Під ред. Р. Я. Гумецького, Б. М. Паляниці, М. Е. Чабан. – Л.: Видавничий центр ЛНУ імені Івана Франка, 2004. – 111 с.
15. Yakimenko I. The effects of low intensity red laser irradiation on hatching eggs in chicken and quail / I. Yakimenko, V. Besulin, A. Testik // International Journal of Poultry Science. – 2002. – № 1-3. – P 6–8.
16. Karu T. I. Molecular mechanism of the therapeutic effect of low-intensity laser radiation / T. I. Karu // Lasers in Life Sciences. – 1988. – № 1. – P. 53–74.
17. Зубкова С. М. О механизме биологического действия излучения гелий-неонового лазера / С. М. Зубкова / Биол. науки. – 1978. – № 7. – С. 30–37.
18. Горбатенкова Е. А. Реактивация супероксиддисмутазы излучением гелий-неонового лазера / Е. А. Горбатенкова, О. А. Азизова, Ю. А. Владимиров // Биофизика. – 1988. – Т. 33. – С. 717–718.
19. Grossman N. 780 nm low power diode laser irradiation stimulates proliferation of keratinocyte cultures: Involvement of oxygen species / N. Grossman, N. Schneid, H. Reuveni // Lasers in Surgery and Medicine. – 1998. – Vol. 22. – P. 212–218.
20. Lindgard A. Irradiation at 634 nm releases nitric oxide from human monocytes / A. Lindgard, L. M. Hulten, L. Svensson, B. Soussi // Lasers Med. Sci. – 2007. – Vol. 22. – P. 30–36.
21. Osipov A. N. Regulation of cytochrome c peroxidase activity by nitric oxide and laser irradiation / A. N. Osipov, G. O. Stepanov, Y. A. Vladimirov [et al.] // Biochemistry (Mosc). – 2006. – Vol. 71. – P. 1128–1132.
22. Liebmann J. Blue-Light Irradiation Regulates Proliferation and Differentiation in Human Skin Cells / J. Liebmann, M. Born, V. Kolb-Bachofen // Journal of Investigative Dermatology. – 2010. – Vol. 130. – P. 259–269.
23. Якименко І.Л. Регуляторна дія низькоінтенсивного видимого світла на соматогенез птиці / І.Л. Якименко, О.С. Цибулін // Доп. НАН України. – 2007. – № 2. – С. 163–167.
24. Мельник М.А. Вплив лазерного випромінювання на ранній ембріональний розвиток перепела японського / М.А. Мельник, І.Л. Якименко // Наук. вісн. НАУ. – 2004. – № 78. – С. 129–134.
25. Цибулін О.С. Дія монохроматичного видимого світла на енергетичну систему мітохондрій / О.С. Цибулін, І. Л. Якименко // Укр. біохім. журн. – 2006. – Т. 78, № 5. – С. 16–21.
26. Гойда Е.А. Биофизические аспекты раннего онтогенеза животных / Емельян Антонович Гойда – К.: Наук. думка, 1993. – 224 с.
27. Мукалов И.О. Перекисное окисление липидов на ранних этапах развития в'юна / И.О. Мукалов, Е.А. Гойда, С.И. Кусень // Укр. биохим. журнал. – 1980. – Т. 52, № 4. – С. 473–477.
28. Тарновська А.В. Перекисне окиснення ліпідів та антиоксидантний статус у зародків в'юна за умов впливу фторхінолонів / А.В. Тарновська, М.В. Дика, Д.І. Санагурський // Наук. вісн. Львів. акад. вет. медицини ім. С.З. Гжицького. – 2004. – Т. 6, № 1. – С. 260–266.
29. Карпенко Ю. В. Вплив світла різного спектрального складу на жирнокислотні профілі мікроскопічних грибів, виділених із зони відчуження Чорнобильської АЕС / Ю. В. Карпенко // Доп. Нац. акад. Наук. – 2008. – № 10. – С. 190–196.
30. Структура и функция биологических мембран / Богач П.Г., Курский М.Д., Кучеренко Н.Е., Рыбальченко В.К. – Киев.: Вища шк. – 1981. – 336 с.
31. Порівняльний аналіз впливу монохроматичного синього світла на активність Na^+ , K^+ -АТФази мембран зародків в'юна за умов in vitro та in vivo / О. М. Семочко, М. В. Бура, С. М. Мандзинець, Я. П. Ференсович [та ін.] // Х з'їзд Укр. біохім. т-ва, м. Одеса, 13-17 вересня, 2010 р.: матеріали доповідей. – Укр. Біохім. журн. – 2010. – Т. 82, № 4 – С. 236.
32. Юшина О.М. Перекисне окиснення ліпідів і мембранний транспорт у зародках холоднокровних / О.М. Юшина // Вісн. Львів. у-ту. Сер. біол. – 2009. – № 49. – С. 3–12.

ВЛИЯНИЕ ИЗЛУЧЕНИЯ СИНЕГО И ЗЕЛЕНОГО СПЕКТРА НА ПРОЦЕССЫ ЛИПОПЕРОКСИДАЦИИ ЗАРОДЫШЕЙ В'ЮНА

Семочко О.М., Мандзинець С.М., Бура М.В., Санагурський Д.И., Ференсович Я.П.

Исследовано влияние монохроматического синего ($\lambda=460$ нм) и зеленого света ($\lambda=530$ нм) на интенсивность процессов липопероксидации, в особенности, образование ТБК-продуктов перекисного окисления липидов зародышей в'юна (*Misgurnus fossilis* L.). Установлено, что излучение в синем и зеленом спектре диапазона определяет дозозависимое увеличение малонового диальдегида, что указывает в свою очередь на интенсификацию ПОЛ на ранних этапах развития зародышей. Низкие дозы излучения не вызывают достоверных изменений процессов свободно радикального окисления, а на стадии 10 деления бластомеров зародышей в'юна наблюдали адаптационные процессы в клетках зародышей в ответ на действие монохроматического излучения.

Ключевые слова: зародыши в'юна, деление бластомеров, синий и зеленый свет, монохроматическое излучение, светодиоды, перекисное окисление.

INFLUENCE OF THE BLUE AND GREEN LIGHT ON PROCESSES OF LIPID PEROXIDATION LOACH EMBRYOS**Semochko O., Mandzynets S., Bura M., Sanagursky D., Ferensovych Ya.**

We research the influence of monochromatic blue ($\lambda = 460$ nm) and green light ($\lambda = 530$ nm) on the lipid peroxidation process, including formation of malonic dialdehyde in loach embryos. Blue and green light increases a dose-dependent concentration of malonic dialdehyde. The blue and green light stimulated lipid peroxidation processes. Green and blue light at a similar intensity did not influence lipid peroxidation.

Key words: loach embryo, division of blastomeres, MDA, blue and green light, monochromatic light, light emitting diode, lipid peroxidation.



УДК 591.147; 612.45; 612.4.09

ДІЯ KISSПЕПТИНУ І МЕЛАТОНІНУ НА ГОНАДИ І КОРУ НАДНИРНИКІВ САМЦІВ ЩУРІВ

Держинський М.Е., Пустовалов А.С., Пазюк Л.М., Бузинська Н.О.,
Калиновський В.Є., Катькова О.В.

Київський національний університет імені Тараса Шевченка,

Навчально-науковий центр «Інститут біології»

E-mail: luba.pazuk@gmail.com

Надійшла до редакції 14.05.2011

При введенні kissпептину щурам посилюється виключно функція клітин Лейдіга у сім'яниках. При цьому мелатонін викликав вірогідне зменшення діаметрів сім'яних каналців і пригнічував останні стадії сперматогенезу, але не змінював показники клітин Лейдіга. При одночасному введенні мелатоніну і kissпептину нами виявлено водночас посилення синтетичної активності клітин Лейдіга і зменшення діаметра сім'яних каналців. На підставі цього можна припустити існування двох ланок регуляції статевої функції: стимулююча ланка kissпептин – ЛГ- клітини Лейдіга - тестостерон, пригнічуюча ланка мелатонін – ФСГ – звивисті сім'яні каналні -сперматогенез. Разом з тим встановлено інгібіторний вплив окремо для мелатоніну і kiss-пептину на синтетичну активність спонгіоцитів кори наднирників. При одночасному їх застосуванні, навпаки, у корі наднирників посилюється кортикостероїдогенез. Ймовірно отримані результати досліджень можна пояснити конкурентним впливом мелатоніну та kissпептину як на регуляторні системи головного мозку, зокрема гіпоталамус і аденогіпофіз, так і на ендокринні залози.

Ключові слова: кіссептин, мелатонін, сім'яник, кора наднирників.

ВСТУП

Відомо, що кіссептинові нейрони стимулюють функцію нейронів гіпоталамуса, що синтезують специфічний регулятор гонадотропної функції люліберин. До того ж кіссептинові нейрони експресують рецептори до андрогенів та естрогенів, які задіяні у негативному зворотному зв'язку між гонадами і гіпоталамусом. Існують дані про дію кіссептину на рівні дистальної частки аденогіпофіза. [1-5]. Інший гормон, що має неоднозначний вплив на репродуктивну систему – це мелатонін. Вважають, що мелатонін негативно впливає на статеву функцію як на рівні гіпоталамуса і гіпофіза, так і безпосередньо діючи на гонади. Його ефекти залежать також від різних факторів, зокрема години введення цього гормону, тривалості введення мелатоніну, дози введеного гормону, довжини фотоперіоду. Встановлено, що кіссептинові нейрони перебувають під впливом мелатоніну епіфіза [6-8]. Існують також припущення, що кіссептин і мелатонін ймовірно залучаються до контролю кортикостероїдогенезу [9,10].

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

У досліді використано статевозрілі самці щурів лінії Вістар двомісячного віку із віварію ННЦ

«Інститут біології». Експерименти планували таким чином, що у кожній групі піддослідних тварин було 5 – 7 особин. Під час проведення дослідів всіх щурів утримували в умовах одного віварію на стандартному харчовому раціоні. Щурів кожної серії дослідів утримували в окремій клітці. Температура у віварії становила 22 – 24⁰ С.

Контрольну групу складали щури, які одержували ін'єкції 0,5 мл ізотонічного розчину хлориду натрія. Наступні серії дослідів проводили на тваринах, що одержували фармакологічні препарати: мелатонін, кіссептин, мелатонін + кіссептин. Дози фармакологічних препаратів розраховували на 100 г маси тіла. У першій серії дослідів мелатонін вводили тваринам 14 діб перорально у дозі 100 мкг. Мелатонін – це гормон, що продукується пінеалоцитами епіфіза. У другій серії дослідів кіссептин вводили за 1 добу до забою внутрішньошлуночково у дозі 10 мкг. Кіссептин – це пептид, який синтезується у нейронах гіпоталамуса. В третій серії дослідів одноразова ін'єкція kissпептину внутрішньошлуночково була зроблена тваринам на тлі хронічного введення мелатоніну.

Наприкінці дослідів щурів усіх груп декапітували. Матеріал для гістологічних досліджень (сім'яники і наднирники) фіксували у 10% розчині формальдегіда. Далі залози обробляли традиційними гістологічними методиками і виготовляли гістологічні препарати.

Зрізи завтовшки 5-6 мкм забарвлювали гематоксилином Бьюера та еозином.

Функціональний стан клітин кори наднирників оцінювали за діаметром ядер спонгіоцитів, оскільки відомо про прямий зв'язок даного параметру із синтетичною активністю клітин. У сім'яниках вимірювали діаметр звивистих сім'яних каналців, який є одним з морфологічних еквівалентів сперматогенезу, і площу поперечного перерізу ядер клітин Лейдіга, що синтезують тестостерон. Водночас візуально оцінювали стадії сперматогенезу.

Одержані гістологічні препарати всіх серій дослідів аналізували на світловому мікроскопі. Мікрофотографії робили за допомогою установки System Microscope з відеокамерою Olympus BX 41 system, обладнаного цифровою фотокамерою Camedia C-5050 zoom і програмним забезпеченням Olympus DP 80 FT 3.2 на базі комп'ютера Pentium 4 з операційною системою Windows XP. Обробку мікрофотографій гістологічних препаратів отриманих на цифровому аналізаторі проводили за допомогою програми Medical Image Analyser (Version 1.0 (c) 2000 Powered by Ander).

Вірогідність різниці між морфометричними показниками контрольних та піддослідних груп птахів оцінювали за t-критерієм Ст'юдента. Статистичну обробку здійснювали за допомогою програмного забезпечення STATISTICA for Windows 5.0.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

У відповідності з метою досліджень проведено морфологічний аналіз реакції сім'яників та

наднирників двомісячник щурів при введенні кіссептину і мелатоніну.

Встановлено, що сперматогенний епітелій у звивистих сім'яних каналцях сім'яників щурів контрольної групи представлений сперматогоніями, сперматоцитами I та II порядку, сперматидами та численними зрілими сперматозоїдами. Інтерстиціальні клітини Лейдіга утворюють скупчення поблизу капілярів. Вони мають округлі світлі ядра з добре помітними ядерцями. У щурів контрольної серії дослідів середній діаметр звивистих сім'яних каналців становить $208,10 \pm 2,26$ мкм, а середня площа перерізу ядер клітин Лейдіга - $21,80 \pm 0,61$ мкм² (табл.1). Виявлені морфометричні показники свідчать про помірну секреторну активність, а стадії сперматогенезу відповідають розвитку статевозрілих тварин.

За отриманими даними введення кіссептину щурам викликало посилення функції клітин Лейдіга у сім'яниках, оскільки їх площа перерізу достовірно збільшувалась у порівнянні з контролем, але діаметр звивистих сім'яних каналців зменшувався: середній діаметр сім'яних каналців становить $205,94 \pm 2,29$ мкм порівняно з контролем $208,10 \pm 2,26$ мкм, а площа перерізу ядра клітини Лейдіга сягає $26,43 \pm 0,55$ мкм². У пінистій цитоплазмі клітин Лейдіга виявляли великі еухроматизовані округлі ядра з яскраво вираженими ядерцями, що вказує на посилення процесів стероїдогенезу. При цьому діаметр звивистих сім'яних каналців хоча зменшувався до $205,94 \pm 2,29$ мкм, але в ньому були наявні у достатній кількості зрілі спермії (табл.1).

Таблиця 1

Морфометричні показники сім'яників у контрольних та піддослідних щурів

Серії дослідів	Діаметр звивистих сім'яних каналців, мкм ²	Площа перерізу ядер клітин Лейдіга, мкм ²
Контроль	$208,10 \pm 2,26$	$21,80 \pm 0,61$
Кіссептин	$205,94 \pm 2,29^*$	$26,43 \pm 0,55^*$
Мелатонін	$193,08 \pm 2,22^*$	$22,15 \pm 0,45$
Мелатонін+кіссептин	$198,49 \pm 2,96^*$	$24,21 \pm 0,45^*$

* - різниця між контрольною та піддослідною групами вірогідна при $p \leq 0,05$

Одержані результати збігаються з літературними даними про причетність кіссептину до регуляції статевої функції у ссавців, і як ми вважаємо, через посилення синтезу ЛГ гонадотропоцитами аденогіпофіза, оскільки загальновідомо, що ЛГ стимулює секрецію тестостерона.

При цьому претендент на роль антагоніста функції гонад мелатонін викликав вірогідне зменшення діаметрів звивистих сім'яних каналців і уповільнював хід сперматогенезу, але не змінював показники клітин Лейдіга, ймовірно пригнічуючи лише синтез ФСГ гонадотропоцитами аденогіпофіза. Так встановлено, що діаметр сім'яних каналців різко зужувався до $193,08 \pm 2,22$ мкм, а площа перерізу ядер

клітин Лейдіга відповідала розмірам $22,15 \pm 0,45$ мкм² близьким до контрольних значень. У складі звивистих сім'яних каналців виявляли сперматогонії, сперматоцити I і II порядків та розрізнені малочисленні сперматозоїди. Клітини Лейдіга виглядали більш темними і мали округлі або витягнуті ядра, що говорить про посилення процесів депонування гормонів у цитоплазмі.

На підставі наведених даних можна зробити висновок про пригнічення останніх стадій сперматогенезу під впливом введення мелатоніну і появи морфологічних ознак зниження секреторної активності клітин Лейдіга.

Навпаки при сумісному введенні мелатоніну і kissпептину нами виявлено, що діаметри звивистих сім'яних каналців зменшуються до $198,49 \pm 2,96$ мкм порівняно з контролем, а площа перерізу ядер клітин Лейдіга збільшується до $24,21 \pm 0,45$ мкм² проти $21,80 \pm 0,61$ мкм² у контрольній серії досліду. Клітини Лейдіга мають світлу пінисту цитоплазму, де є округлі, світлі ядра з добре помітними ядерцями. У складі сперматогенного епітелію виявляються всі типи клітин, включаючи зрілі сперматозоїди.

Отже оскільки при одночасному введенні мелатоніну і kissпептину нами виявлено водночас посилення синтетичної активності клітин Лейдіга і зменшення діаметра сім'яних каналців можна припустити існування двох ланок регуляції статевих функцій: стимулююча ланка kissпептин – ЛГ- клітини

Лейдіга - тестостерон, пригнічуюча ланка мелатонін – ФСГ – звивисті сім'яні каналці - сперматогенез.

Аналіз гістологічних препаратів наднирників показав, що при введенні тваринам kissпептину вірогідно зменшується функціональну активність спонгіоцитів пучкової і сітчастої зони кори порівняно з контролем (табл. 2), де виробляються переважно глюкокортикоїди і незначна кількість статевих гормонів. Ці клітини були темнозбарвлені, що вказує на зниження процесів секреції гормонів.

При цьому також встановлено інгібіторний вплив мелатоніну на синтетичну активність спонгіоцитів клубочкової, пучкової і сітчастої зон кори наднирників, про що свідчать морфофункціональні дані вимірювань і відповідний стан клітин, для яких було характерна більш темна гомогенна цитоплазма, без ознак накопичення стероїдів (табл. 2).

Таблиця 2

Морфометричні показники наднирників у контрольних та піддослідних щурів

Серії досліду	Діаметри поперечного розрізу ядер спонгіоцитів кори наднирників, мкм		
	Клубочкова зона	Пучкова зона	Сітчаста зона
Контроль	$4,70 \pm 0,05$	$5,52 \pm 0,05$	$4,94 \pm 0,05$
Кісспептин	$4,65 \pm 0,05$	$5,22 \pm 0,04^*$	$4,58 \pm 0,05^*$
Мелатонін	$4,57 \pm 0,05^*$	$5,35 \pm 0,05^*$	$4,09 \pm 0,04^*$
Мелатонін+Кісспептин	$4,85 \pm 0,07^{*\diamond}$	$5,55 \pm 0,05^\diamond$	$5,20 \pm 0,06^{*\diamond}$

* - різниця між контрольною та піддослідною групами вірогідна при $p \leq 0,05$

$\diamond$ - різниця між групами мелатонін і мелатонін + кісспептин вірогідна при $p \leq 0,05$

Разом з тим при одночасному введенні піддослідним тваринам мелатоніну і kissпептину у корі наднирників переважно посилюється кортикостероїдогенез порівняно з введенням мелатоніну і контролем. Такі висновки нами зроблені на підставі достовірного збільшення площі поперечного перерізу ядер спонгіоцитів кори до $4,85 \pm 0,07$ мкм у клубочковій зоні, до $5,55 \pm 0,05$ мкм у пучковій зоні і до $5,20 \pm 0,06$ мкм у сітчастій зоні. Спонгіоцити цих зон мають пінисту цитоплазму, що свідчить про наявність ліпідних крапель, округлі еухроматизовані ядра з чіткими ядерцями, що означає посилення секреторної активності.

Вважаємо, що отримані результати досліджень про вплив мелатоніну і kissпептину на функцію наднирників можна пояснити їх конкурентним впливом на регуляторні системи головного мозку, зокрема гіпоталамус і аденогіпофіз, і складною системою взаємозв'язку між цими гормонами в організмі.

ВИСНОВКИ

При введення kissпептину щурам достовірно збільшується площа перерізу ядер клітин Лейдіга, що свідчить про посилення синтезу тестостерона. Одержані результати можна пояснити дією kissпептину на синтез ЛГ аденогіпофіза, що є

специфічним регулятором стероїдогенезу. Введення мелатоніну пригнічує останні стадії сперматогенезу і посилює процеси депонування статевих стероїдів у цитоплазмі клітин Лейдіга. Одночасне введення kissпептину і мелатоніну підтверджує попередні висновки. Отже можна припустити існування двох ланок регуляції статевих функцій: стимулююча ланка kissпептин – ЛГ- клітини Лейдіга (синтез тестостерона), пригнічуюча ланка мелатонін – ФСГ – звивисті сім'яні каналці (сперматогенез).

Разом з тим встановлено інгібіторний вплив окремо для мелатоніну і kissпептину на синтетичну активність спонгіоцитів кори наднирників. При одночасному їх застосуванні, навпаки, у корі наднирників посилюється кортикостероїдогенез. Ймовірно отримані результати досліджень можна пояснити конкурентним впливом мелатоніну та kissпептину як на регуляторні системи головного мозку, зокрема гіпоталамус і аденогіпофіз, так і на ендокринні залози.

Література

1. Colledge W. H. Kisspeptins and GnRH neuronal signaling // Trends Endocrinol. Metab. – 2009. – Vol. 20. – P.115–121.
2. Irwig M.S., Fraley G.S., Smith J.T., Acohido B.V., Popa S.M., Cunningham M.J., Gottsch M.L., Clifton D.K., Steiner R.A. Kisspeptin activation of gonadotropin releasing hormone neurons and regulation of KiSS-1 mRNA in the

- male rat // *Neuroendocrinology*. – 2004. – Vol. 80. – P. 264–272.
3. Decourt C., Tillet Y., Caraty A., Franceschini I., Briant C. Kisspeptin immunoreactive neurons in the equine hypothalamus interactions with GnRH neuronal system // *J. Chem. Neuroanat.* – 2008. – Vol. 36. – P.131–137.
 4. Gutiérrez-Pascual E., Martínez-Fuentes A.J., Pinilla L., Tena-Sempere M., Malagyn M.M., Castaco J.P. Direct pituitary effects of kisspeptin: activation of gonadotrophs and somatotrophs and stimulation of luteinising hormone and growth hormone secretion // *Neuroendocrinol.* – 2007. – Vol. 19. – P. 521–530.
 5. Justyna Pielecka-Fortuna, R. Anthony DeFazio, Suzanne M. Moenter. Feedback regulation and kisspeptin action on gonadotropin-releasing hormone neurons in mice // *Biol. Reprod.* – 2011. – Vol. 85. – P. 987-995.
 6. Пустовалов А.С. Вплив імунізації, введення мелатоніну, серотоніну та епіфізектомії на гіпоталамо-гонадну систему птахів (гістофізіологічний аналіз): Автореф. дис. на здобуття вч.ст. канд. біол. наук: 03.00.11. – К., 2003. – 16 с.
 7. Monica B. Frungieri, Artur Mayerhofer, Karina Zitta, Omar P. Pignataro, Ricardo S. Calandra, Silvia I. Gonzalez-Calvar. Direct effect of melatonin on syrian hamster testes: melatonin subtype 1a receptors, inhibition of androgen production, and interaction with the local corticotropin-releasing hormone system // *Endocrinology*. – 2005 -146: - P. 1541-1552.
 8. Nicolette L. McGuire, Kristina Kangas, George E. Bentley. Effects of melatonin on peripheral reproductive function: regulation of testicular gnih and testosterone // *Endocrinology*. – 2011. – 152, N 9. – P. 3461-3470.
 9. Dungan H.M. , Clifton D.K, Steiner R.A. Minireview: Kisspeptin neurons as central processors in the regulation of gonadotropin-releasing hormone secretion // *Endocrinology*. – 2006. - Vol. 147, N 3. - P 1154-1158.
 10. Oakley A.E. , Clifton D.K., Steiner R. A. Kisspeptin Signaling in the Brain // *Endocrine Reviews*. – 2009. - Vol. 30, N 6. – P. 713-743.

ДЕЙСТВИЕ КИСПЕПТИНА И МЕЛАТОНИНА НА ГОНАДЫ И КОРУ НАДПОЧЕЧНИКОВ САМЦОВ КРЫС

Дзержинський М.Е., Пустовалов А.С., Пазюк Л.М., Бузинська Н.О., Калиновський В.Є., Катькова О.В.

При введении ксипептина крысам усиливается исключительно функция клеток Лейдига в семенниках. При этом мелатонин вызывал достоверное уменьшение диаметров семенных канальцев и подавлял последние стадии сперматогенеза, но не изменял показатели клеток Лейдига. При одновременном введении мелатонина и ксипептина нами выявлено усиление синтетической активности клеток Лейдига и уменьшение диаметра семенных канальцев. На основании этого можно предположить существование двух элементов регуляции половой функции: стимулирующего (ксипептин – ЛГ – клетки Лейдига – тестостерон) и подавляющего (мелатонин – ФСГ – извитые семенные канальцы – сперматогенез). В то же время установлено ингибиторное влияние отдельно для мелатонина и ксипептина на синтетическую активность спонгиозитов коры надпочечников. При одновременном их введении, наоборот, в коре надпочечников усиливается кортикостероидогенез. Вероятно полученные результаты исследований можно объяснить конкурентным влиянием мелатонина и ксипептина как на регуляторные системы головного мозга, в частности гипоталамус и аденогипофиз, так и на эндокринные железы.

Ключевые слова: ксипептин, мела тонин, семенник, кора надпочечников.

ACTION OF KISSPEPTIN AND MELATONIN ON GONADS AND ADRENAL CORTEX OF MALE RATS

Dzerzhinsky M.E., Pustovalov A.S., Pazyuk L.M., Buzinska N.O., Kalynovskyi V.E., Katkova O.V.

Kisspeptin administration activate Leudig cells on rat testis. Thus melatonin caused decrease of diameter of testis tubules and suppress last stages of spermatogenesis, but no effect on Leudig cells. It was shown that melatonin and kisspeptin combined administration caused activate Leudig cells function and decrease of diameter of testis tubules. It was suggested two-ways regulation of rat reproductive function. The stimulate way is kisspeptin-LH-Leudig cells-testosterone. The suppress way is melatonin-FSH-testis tubules–spermatogenesis. At the same time both melatonin and kisspeptin inhibit adrenal spongiocytes. On the contrary melatonin and kisspeptin combined administration increased steroidogenesis in the adrenal cortex. It is possible that melatonin and kisspeptin have rival interactions on brain regulation level (hypothalamus and adenohipophysis) and endocrine gland directly.

Key words: kisspeptin, melatonin, testis, adrenal cortex

УДК 577.1

ВПЛИВ ПРЕПАРАТУ «ГРІНІЗАЦІЯ ГРІН R» НА ЗЛОЯКІСНИЙ РІСТ У ЩУРІВ З КАРЦИНОМОЮ ГЕРЕНА, А ТАКОЖ З РЕЗИСТЕНТНОЮ ФОРМОЮ КАРЦИНОМИ ГЕРЕНА

Хіміч М.В., Раєцька Я.Б., Строцька Є.А., Преображенська Т.Д., Остапченко Л.І.

Інститут біології, Київського національного університету імені Тараса Шевченка, Київ, Україна,
e-mail: mykolah@rambler.ru

Надійшла до редакції 25.05.2011

Досліджено ступінь гальмування росту пухлини у динаміці її росту при розвитку карциноми Герена та резистентної форми карциноми Герена за умов введення дослідного препарату «Грінізація Грін R». Показано, що дослідний препарат має стабілізуючий вплив на злоякісний ріст резистентного штаму карциноми Герена, найбільш ефективною експериментально встановленою дозою є 136 мг/кг. Даний ефект є важливим, оскільки з кожним роком стає все більше резистентних пухлин, на які не впливають сучасні препарати, які застосовуються в онкології.

Ключові слова: резистентність, карцинома Герена, біологічно активні речовини.

ВСТУП

На сьогоднішній день експериментальними і клінічними спостереженнями переконливо доведена перспективність використання засобів природного походження в комбінованій терапії онкологічних захворювань. Дуже часто основною причиною терапевтичних невдач у лікуванні хворих на рак є формування резистентності пухлин до різних хіміопрепаратів. Тому особливий інтерес викликають препарати, що підвищують протипухлинну резистентність, що перешкоджають розвитку метастазів і рецидивів пухлин, що знижують токсичні прояви хіміотерапії [4,5]. Крім класичної фітотерапії, нині у світі широко застосовуються харчові добавки (БАД), як в комплексному лікуванні так і для профілактики захворювань [6,7,8,9,10]. Одним з таких препаратів є «Грінізація Грін R» - розроблений в Україні, представляє собою порошкову форму очищених білкових фракцій голотурії далекосхідної і вермікультури, зроблених по спеціальній технології (не ферментативний, багатоступінчатий, низькотемпературний), що дозволяє уникнути денатурації білків, збільшити їх біодоступність, зберегти глобулярний стан з повним збереженням регуляторних пептидів ядерних ДНК та їх функціональних якостей.

Метою нашої роботи було оцінити ступінь гальмування росту пухлини у динаміці її росту при розвитку карциноми Герена та резистентної карциноми Герена на фоні введення дослідного препарату «ГРІН-R».

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Досліди проводились на 100 білих лабораторних щурах-самках масою 180 ± 20 г, яких утримували на стандартній дієті віварію. Експеримент відбувався в 2-і паралелі:

1-а паралель (прищеплення резистентної карциноми Герена).

Тваринам трансплантували резистентну карциному Герена шляхом підшкірної ін'єкції у ділянку стегна задньої кінцівки 20%-ної суспензії пухлинних клітин на 0,9%-ному розчині NaCl, отриманих від щурів-донорів [1,2] (штам пухлини наданий Інститутом експериментальної патології, онкології та радіобіології ім. Р.Кавецького НАН України).

Частині тварин щоденно протягом 21-ї доби після прищеплення пухлини вводили дослідний препарат в різних дозах.

Піддослідні тварини були розділені на 5 груп:

1 — контроль, інтактні щури, що отримували розчин NaCl - 1 мл;

2 — щури з прищепленою резистентною карциномою Герена, що отримували розчин NaCl - 1 мл.

3 — щури з прищепленою резистентною карциномою Герена, що отримували препарат «Грінізація Грін R» в дозі 90 мг/кг.

4 — щури з прищепленою резистентною карциномою Герена, що отримували препарат «Грінізація Грін R» в дозі 136 мг/кг.;

5 — щури з прищепленою резистентною карциномою Герена, що отримували препарат «Грінізація Грін R» в дозі 180 мг/кг.

2-га паралель (прищеплення карциноми Герена).

Тваринам трансплантували карциному Герена шляхом підшкірної ін'єкції у ділянку стегна задньої кінцівки 20%-ної суспензії пухлинних клітин на 0,9%-ному розчині NaCl, отриманих від щура-донора [1,2] (штам пухлини наданий Інститутом експериментальної патології, онкології та радіобіології ім. Р.Кавецького НАН України).

Частині тварин щоденно протягом 21-ї доби після прищеплення пухлини вводили дослідний препарат в різних дозах.

Піддослідні тварини були розділені на 5 груп:

1 — контроль, інтактні щури, що отримували розчин NaCl - 1 мл;

2 — щури з прищепленою карциномою Герена, що отримували розчин NaCl - 1 мл.

3 — щури з прищепленою карциномою Герена, що отримували препарат «Грінізація Грін R» в дозі 90 мг/кг;

4 — щури з прищепленою карциномою Герена, що отримували препарат «Грінізація Грін R» в дозі 136 мг/кг;

5 — щури з прищепленою карциномою Герена, що отримували препарат «Грінізація Грін R» в дозі 180 мг/кг.

На 7-му добу після прищеплення починали визначати об'єм пухлини до 21 доби.

Ефективність протипухлинної дії препарату, оцінювали за ступенем гальмування росту пухлини, у динаміці її об'єм реєстрували за формулою:

$$V = \frac{(a+b)^3}{16}$$

де a — більший, діаметр пухлини, b — менший діаметр пухлини.

Тварин під легким ефірним наркозом декапітували через 21 добу після перевивання пухлин.

Отримані результати статистично обробляли на основі критерію Стюдента. Зміни показників вважали достовірними при $p < 0,05$; при $p > 0,05$ зміни враховували як тенденцію [3].

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

На першому етапі нашої роботи, було досліджено вплив «Грінізація Грін R» на злоякісний ріст у щурів з прищепленою резистентною карциномою Герена. В ході дослідження були отримані наступні дані:

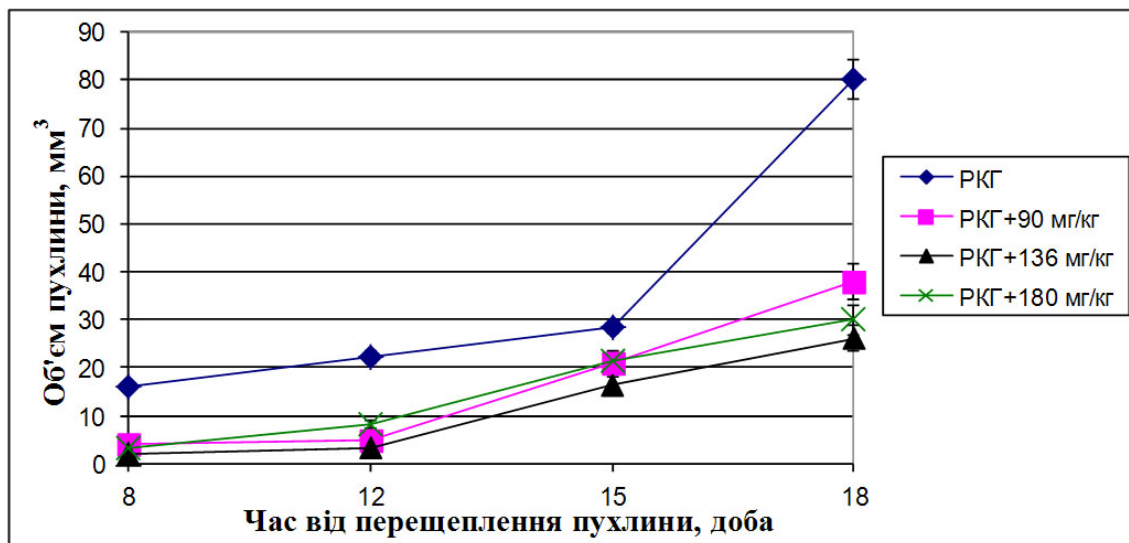


Рис.1. Динаміка середніх об'ємів резистентної карциноми Герена у щурів при застосуванні дослідного препарату «Грінізація Грін R».

Примітка: РКГ — резистентна карцинома Герена; * - вірогідні зміни порівняно з РКГ тваринами ($p < 0,05$).

Спостереження за тваринами вели впродовж 21 доби після прищеплення пухлини, заміри пухлин здійснювали на 8, 12, 15 та 18 добу після прищеплення резистентної карциноми Герена.

На першому етапі досліджень було показано, що дослідний препарат «Грінізація Грін R» має стабілізуючий вплив на злоякісний ріст резистентного штаму карциноми Герена. Даний ефект спостерігається протягом усього терміну досліджень, порівняно з пухлинним контролем (резистентною карциномою Герена).

При порівняльному вивченні трьох варіантів доз «Грінізація Грін R» на щурів з прищепленою

резистентною карциномою Герена, ми дійшли висновку: найбільш ефективною експериментально встановленою дозою є 136 мг/кг. Дане спостереження було зроблене за двома критеріями: величина гальмування росту пухлини та збільшення тривалості життя щурів по відношенню до дослідного контролю.

На другому етапі наших досліджень, було досліджено вплив препарату «Грінізація Грін R» на злоякісний ріст у щурів з прищепленою карциномою Герена. В ході дослідження були отримані наступні дані:

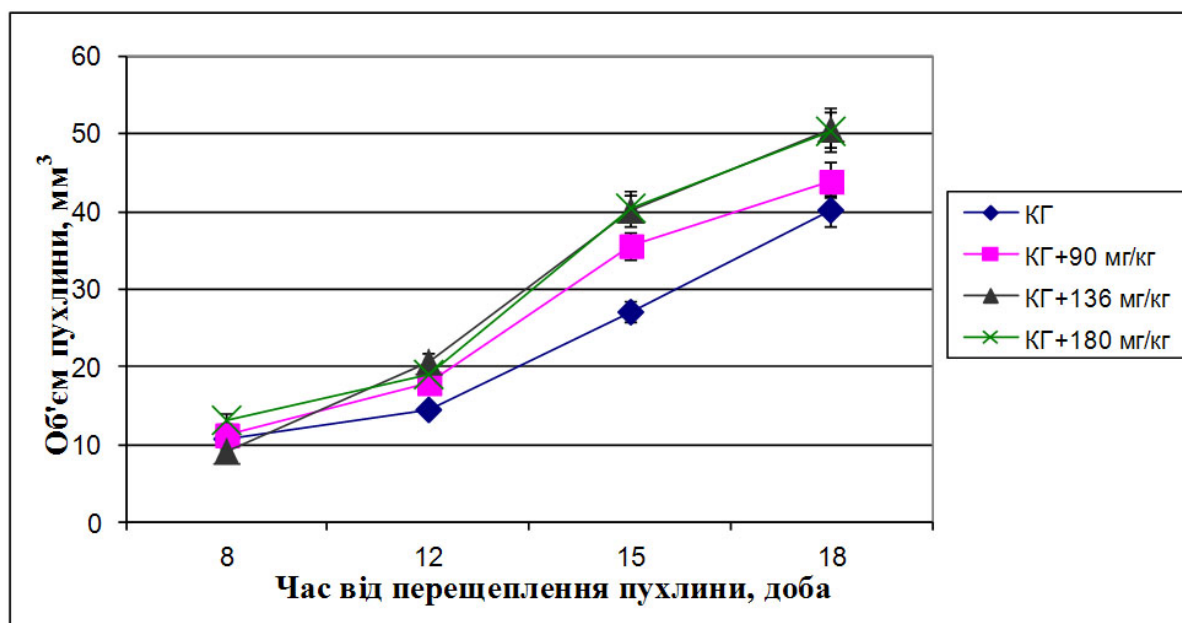


Рис.2. Динаміка середніх об'ємів карциноми Герена у щурів при застосуванні дослідного препарату «Грінізація Грін R». Примітка: КГ - карцинома Герена; * - вірогідні зміни порівняно з КГ тваринами ($p<0,05$).

На другому етапі досліджень було показано, що препарат «Грінізація Грін R» мав протилежний вплив на злоякісний ріст штаму карциноми Герена, порівняно з резистентним штамом. Даний ефект спостерігається протягом усього терміну досліджень, порівняно з пухлинним контролем (карциноми Герена).

Отримані дані є цікавими для онкології, дія дослідного препарату «Грінізація Грін R» потребує детального вивчення можливих механізмів протипухлинної дії даного препарату.

Важливим фактом, що був встановлений в результаті експерименту, є те що, препарат «Грінізація Грін R» впливає найбільшою мірою саме на резистентний штам пухлини. Це є важливим, оскільки з кожним роком стає все більше резистентних пухлин, на які не впливають сучасні препарати, які застосовуються в онкології.

ВИСНОВКИ

Досліджено ступінь гальмування росту пухлини у динаміці її росту при розвитку карциноми Герена та резистентної карциноми Герена на фоні введення дослідного препарату «Грінізація Грін R».

На першому етапі досліджень було показано, що дослідний препарат «Грінізація Грін R» має стабілізуючий вплив на злоякісний ріст резистентного штаму карциноми Герена, найбільш ефективною експериментально встановленою дозою є 136 мг/кг.

На другому етапі досліджень було показано, що препарат «Грінізація Грін R» мав протилежний вплив на злоякісний ріст штаму карциноми Герена, порівняно з резистентним штамом.

Література

1. *Кавецкий Р.Е.* Реактивность организма и опухолевый рост. Киев: Наук.думка, 1981. 432 с.
2. *Димант И.И., Шаритов Р.К., Муратходжаев Н.К. и др.* Окислительные процессы и опухолевый рост. Ташкент: Изд.-полиграф. объединение им. Ибн.Сины, 1992. 155 с.
3. *Иванов Ю.И., Погорелюк О.М.* Статистическая обработка результатов медико-биологических исследований на микрокалькуляторах за программами. М.: Медицина, 1990. 224 с.
4. *Венгеровский А.И., Белобородова Э.И. Калинкина Г.И., Бычкова Н.К.* Методические рекомендации по применению биологически активных добавок к пище производства ООО «Биолит» в профилактике и комплексном лечении. - Томск, 2004 -90 с.
5. *Невожай В.И., Юдин С.В.* Советы онкологическому больному (если вам предстоит лечение). Владивосток, 2003 -35 стр.
6. *Е.Д. Гольдберг, Е.П. Зуева,* Препараты из растений в комплексной терапии злокачественных новообразований. Томск, 2000., 129с.
7. *Харченко Н.В., Анохина Г.А., Пилецкий А.М. и др.* Использование функционального питания в лечении больных неалкогольным стеатогепатитом. / В: Сборник научных трудов НМАПО имени П. Л. Шупика. — Выпуск 17. — К., 2008 Т. книга 3. — С. 390—397. — ISBN 966-391-056-9.
8. *Донченко Г.В., Игрунова К. Н., Ткаленко А. Н., Трубина Т. А., Ковалева Т. В.* Опыт и перспективы применения мультинутриентных функционально-пептидных комплексов. / Международный вестник медицины (International medical bulletin). — 2009 Т. 2. № 1-2. — С. 97 - 102.
9. *Печенка А. М., Голубовская О. А.* Тромбоцитопения при вирусном гепатите С и возможности её коррекции МНФК Грінізація. / В: Сборник научных трудов НМАПО имени

- П. Л. Шупика. — Выпуск 17. — К., 2008 Т. книга 3. — С. 336—341. — ISBN 966-391-056-9.
10. *Lozitsky V., Gomolyako I., Pozdnyakov S., Fedchuk A., Gridina T., Socheslo L., Pushkina V., Klochkova N., Shestakov V.* Anti-influenza Action of Multinutrient Functional Peptide Complex (MFPC) Grinization®. / *Antiviral Research.* — 2010 Т. 86. Iss.1. doi:10.1016/j.antiviral.2010.02.386. — С. A38.

ВЛИЯНИЕ ПРЕПЕРАТА «ГРИНИЗАЦИЯ ГРИН R» НА ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫЙ РОСТ У КРЫС С КАРЦИНОМОЮ ГЕРЕНА, А ТАКЖЕ С РЕЗИСТЕНТНОЙ ФОРМОЙ КАРЦИНОМЫ ГЕРЕНА

Химич Н.В., Раецкая Я.Б., Строщкая Є.А., Преображенская Т.Д., Остапченко Л.И.

Исследовано степень торможения роста опухоли в динамике ее роста при развитии карциномы Герена и резистентной формы карциномы Герена при условии введения исследованного препарата «Гринизация Грин R». Показано, что исследованный препарат имеет стабилизирующее влияние на злокачественный рост резистентного штамма карциномы Герена, наиболее эффективной экспериментально установленной дозой есть 136 мг/кг. Данный эффект является важным, поскольку с каждым годом все больше резистентных опухолей, на которые не влияют современные препараты, которые используются в онкологии.

Ключевые слова: резистентность, карцинома Герена, биологично активные вещества.

EFFECT "GRINIZATSIYA GREENE R» ON MALIGNANT GROWTH IN RATS GUERIN' CARCINOMA ALSO OF RESISTANT GUERIN'S CARCINOMA

Khimich M.V., Raetska Ya.B., Strotska E.A. , Preobrajenska T.D., Ostapchenko L.I.

Here was investigated the degree of the slowdown of the cancer growth in its growth dynamics during the development of the Guerin's carcinoma and the resistant form of the Guerin's carcinoma under the administration of the investigated compound "Grinization Green R". It was shown, that the investigated compound has a stabilizing influence on the malignant growth of the resistant type of the Guerin's carcinoma. The most effective experimentally estimated dose is 136 mg/kg. This effect is important, because there is a permanently growing number of the resistant tumors, which failed to respond to the modern drug treatment.

Key words: resistance, Guerin's carcinoma, biologically active substances.

УДК 591.147; 612.4

ВПЛИВ МЕЛАТОНІНУ НА ГІПОТАЛАМО-ТИРЕОЇДНУ СИСТЕМУ ПТАХІВ: ЕФЕКТ БЛОКАДИ ДОФАМІНОВИХ D1-РЕЦЕПТОРІВ

Нужина Н.В., Варенюк І.М., Орлова Н., Дзержинський М.Е.

Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ; e-mail: varenyuk@univ.kiev.ua

Надійшла до редакції 09.08.2011

Мета даного дослідження – з'ясувати можливість залучення дофамінових D1-рецепторів до можливої участі дофамінергічної системи головного мозку в реалізації ефектів мелатоніну на гіпоталамо-тиреоїдну систему в птахів у різний час доби. Для цього японським перепелам вранці, вдень, ввечері або вночі однократно вводили фізіологічний розчин (контрольна група), мелатонін, блокатор дофамінових D1-рецепторів R(+)-SCH 23390 гідрохлорид, або мелатонін після блокади D1-рецепторів. Показано, що в певні періоди доби вплив мелатоніну на морфометричні параметри пінеалоцитів епіфіза, нейроцитів гіпоталамічних ядер (супрахізматичного, аркуатного, паравентрикулярного) та щитоподібної залози після блокади D1-рецепторів відрізняється від впливу самого мелатоніну, і ця різниця не може бути пояснена простою сумациєю ефектів. А тому зроблено висновок, що у птахів дофамін через D1-рецептори може опосередковувати ефекти мелатоніну на центральні гіпоталамічні структури гіпоталамо-тиреоїдного комплексу ввечері, а на саму щитоподібну залозу – вдень та вночі, і не залучений в інший час доби.

Ключові слова: мелатонін, дофамінові рецептори, R(+)-SCH 23390 гідрохлорид, щитоподібна залоза, гіпоталамус, епіфіз, птахи.

ВСТУП

Щитоподібна залоза є важливою ендокринною залозою у вищих хребетних. На сьогодні відомо, що функціональна активність щитоподібної залози перебуває під контролем гіпофіза, а той, в свою чергу, регулюється гіпоталамусом. Разом вони складають гіпоталамо-гіпофізарно-тиреоїдну систему. Досить важливою екстрагіпоталамічною структурою, що бере участь у регуляції гіпоталамо-гіпофізарно-тиреоїдної системи є епіфіз – орган, який за допомогою свого основного гормона мелатоніну регулює добові та сезонні біоритми. Численні дослідження свідчать про залучення мелатоніну до регуляції щитоподібної залози [1, 4, 5, 7, 8, 9]. На циркадний ритм виділення мелатоніну впливає дофамін [3, 10]. В літературі існують поодинокі дані, що частина ефектів мелатоніну на функціональну активність гіпоталамо-тиреоїдної системи може бути опосередкована його впливом на синтез та виділення дофаміну [6]. Тому метою даного дослідження було з'ясувати можливість залучення дофамінових D1-рецепторів до можливої участі дофамінергічної системи головного мозку в реалізації ефектів мелатоніну на гіпоталамо-тиреоїдну систему в різний час доби.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Дослідження було проведено на самцях японських перепелів (*Coturnix japonica*) 5-тижневого віку. Птахів утримували в умовах одного віварію на стандартному раціоні (їжа – комбікорм пташиний виробництва

Київського комбікормового заводу, вода – ad libitum); температура – +22-23 °C; світловий режим: 14 годин – світло (з 7 до 21 години), 10 годин – темрява (з 21 до 7 години).

Було сформовано 16 експериментальних груп по 5 птахів у кожній групі. Їм у відповідний час доби одноразово давали: 1.) фізіологічний розчин вранці (о 7:00) (контрольна група); 2.) мелатонін вранці (о 7:00) в дозі 10 мкг (тут і далі всі дози вказані з розрахунку на 100 г маси тіла); 3.) R(+)-SCH 23390 гідрохлорид (блокатор дофамінових D1-рецепторів) вранці (о 6:00) в дозі 8 мкг; 4.) R(+)-SCH 23390 гідрохлорид вранці (о 6:00) в дозі 8 мкг, а через годину (о 7:00) мелатонін у дозі 10 мкг; 5.) фізіологічний розчин вдень (о 13:00) (контрольна група); 6.) мелатонін вдень (о 13:00) в дозі 10 мкг; 7.) R(+)-SCH 23390 гідрохлорид вдень (о 12:00) в дозі 8 мкг; 8.) R(+)-SCH 23390 гідрохлорид вдень (о 12:00) в дозі 8 мкг, а через годину (о 13:00) мелатонін в дозі 10 мкг; 9.) фізіологічний розчин ввечері (о 19:00) (контрольна група); 10.) мелатонін ввечері (о 19:00) в дозі 10 мкг; 11.) R(+)-SCH 23390 гідрохлорид ввечері (о 18:00) в дозі 8 мкг; 12.) R(+)-SCH 23390 гідрохлорид ввечері (о 18:00) в дозі 8 мкг, а через годину (о 19:00) мелатонін у дозі 10 мкг; 13.) фізіологічний розчин вночі (о 1:00) (контрольна група); 14.) мелатонін вночі (о 1:00) в дозі 10 мкг; 15.) R(+)-SCH 23390 гідрохлорид вночі (в 0:00) в дозі 8 мкг; 16.) R(+)-SCH 23390 гідрохлорид вночі (в 0:00) в дозі 8 мкг, а через годину (о 1:00) мелатонін у дозі 10 мкг. Фізіологічний розчин вводили перитонеально в кількості 0,2 мл на птаха.

R(+)-SCH 23390 гідрохлорид розчиняли у фізіологічному розчині і вводили за допомогою стереотаксичного приладу в порожнину третього шлуночка мозку. Мелатонін замішували у борошніні кульки і давали перорально.

Через 2 години після введення відповідного препарату птахів декапітували (групи 1-4 – о 9:00, групи 5-8 – о 15:00, групи 9-12 – о 21:00, групи 13-16 – о 3:00).

Для досліджень брали гіпоталамічну область мозку, епіфіз та щитоподібну залозу, які фіксували в фіксаторі Буена. Потім отриманий матеріал заливали в парафін і виготовляли парафінові зрізи товщиною 5-6 мкм. Зрізи гіпоталамуса фарбували за методикою Ніссля, зрізи епіфіза – гематоксилином Бемера, зрізи щитоподібної залози – гематоксилином Бемера й еозином [2].

Гістологічні препарати аналізували на світловому мікроскопі за допомогою окуляр-мікрометра МОВ-1-15х і морфометричної установки з використанням комп'ютерної програми Promorph-Paradise for Windows. На зрізах гіпоталамуса вимірювали діаметр ядер нейронів аркуатного, супрахізматичного і паравентрикулярного ядер, на зрізах епіфіза – площу перетину ядер пінеалоцитів, на зрізах щитоподібної залози – висоту тироїдного епітелію та внутрішній діаметр фолікулів.

Статистичну обробку здійснювали методами варіаційної статистики за допомогою програмного забезпечення STATISTICA 5,0 for Windows. Визначали достовірність різниці між контрольною та іншими групами у той самий час доби. Крім того, додатково порівнювали групу, яка отримувала мелатонін, з групою, яка отримувала мелатонін разом з R(+)-SCH 23390 гідрохлоридом. Вірогідність різниці між порівнюваними групами оцінювали за t-критерієм Стьюдента. Вірогідною вважали різницю між порівнюваними показниками при $P < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Як видно з таблиці 1, мелатонін у різний час доби чинить різний вплив на досліджені морфометричні параметри епіфіза, щитоподібної залози та гіпоталамічних ядер. Вранці введення мелатоніну веде до зниження внутрішнього діаметра фолікулів щитоподібної залози (такі морфометричні зміни є свідченням зростання активності цієї залози). Також зростає діаметр ядер нейроцитів супрахізматичного ядра. Інші виміряні морфометричні параметри не змінюються. Вдень мелатонін стимулює циркадну систему перепелів (пінеалоцити епіфіза та нейрони супрахізматичного ядра), підвищує діаметр ядер нейронів паравентрикулярного ядра і знижує діаметр ядер нейронів аркуатного ядра, але не веде до достовірних змін у щитоподібній залозі (табл. 1). Ввечері також має місце зростання досліджених морфометричних параметрів у циркадній системі і відсутність подібних змін у щитоподібній залозі. Крім

того, мелатонін у цей час активує нейроцити аркуатного ядра. Вночі у щитоподібній залозі під впливом мелатоніну зростає висота тироцитів і не зазнає достовірних змін внутрішній діаметр фолікулів (табл. 1). В різних гіпоталамічних ядрах зміни діаметра ядер нейронів різноспрямовані – цей параметр зростає у аркуатному ядрі, знижується в паравентрикулярному ядрі і не змінюється в супрахізматичному ядрі. Крім того, зростає площа перетину ядер пінеалоцитів епіфіза (табл. 1).

Блокатор D1-рецепторів R(+)-SCH 23390 гідрохлорид також по-різному впливає на щитоподібну залозу залежно від часу доби: вранці та вдень він знижує висоту тироцитів та діаметр фолікулів, а ввечері й вночі підвищує висоту тироцитів і не впливає на діаметр фолікулів (табл. 1). Проте на гіпоталамічні ядра та пінеалоцити епіфіза домінує гальмівний вплив R(+)-SCH 23390 гідрохлориду (табл. 1), що свідчить про те, що через D1-рецептори передається в основному стимулюючий вплив дофаміну на ці структури.

Вечірнє введення мелатоніну, як вже зазначалось, підвищує діаметр ядер нейронів аркуатного ядра і є тенденція до зростання діаметра нейросекреторних клітин паравентрикулярного ядра (табл. 1). Блокада D1-рецепторів R(+)-SCH 23390 гідрохлоридом змінює характер впливу мелатоніну на ці ядра у вечірній час доби. Введення мелатоніну після блокади D1-рецепторів R(+)-SCH 23390 гідрохлоридом веде до зниження діаметра ядер нейронів аркуатного та паравентрикулярного ядер (табл. 1). Оскільки введення блокатора D1-рецепторів R(+)-SCH 23390 гідрохлориду в цей час доби не змінює двох вищезазначених морфометричних параметрів (табл. 1), то логічно припустити існування більш складної взаємодії між блокадою дофамінових D1-рецепторів та введенням екзогенного мелатоніну, ніж проста сумація ефектів. Подібною є ситуація у вечірній час доби і стосовно впливу на пінеалоцити епіфіза. Проте на щитоподібну залозу такий ефект відсутній. Тут діаметр фолікулів не зазнає достовірних змін (табл. 1). Висота ж тироцитів не змінюється після введення тільки мелатоніну і зростає після введення мелатоніну на фоні заблокованих R(+)-SCH 23390 гідрохлоридом дофамінових D1-рецепторів (табл. 1), що може бути пояснено активуючим впливом самого R(+)-SCH 23390 гідрохлориду (бо він у цей період доби, як видно з таблиці 1, чинить стимулюючий вплив). Тобто, у вечірній час доби частина ефектів мелатоніну на циркадну систему (епіфіз та супрахізматичні ядра гіпоталамуса) та на досліджені гіпоталамічні ядра, але не на саму щитоподібну залозу може бути опосередкована дофаміном, який в цей час доби реалізує свій вплив через D1-рецептори.

Нічне введення мелатоніну після введення блокатора D1-рецепторів R(+)-SCH 23390 гідрохлориду за своїм впливом на досліджені морфометричні параметри гіпоталамуса та епіфіза достовірно не відрізняється від нічного введення самого лише

мелатоніну (табл. 1). Проте діаметр фолікулів щитоподібної залози не змінюється після введення мелатоніну чи R(+)-SCH 23390 гідрохлориду поодиночі, але зростає після їх сумарного введення (табл. 1), що

свідчить про можливу взаємодію між мелатоніном та дофаміном при дії мелатоніну на щитоподібну залозу.

Таблиця 1.

Морфометричні показники активності епіфіза, гіпоталамічних ядер та щитоподібної залози після введення мелатоніну та блокади дофамінових D1-рецепторів R(+)-SCH-23390 гідрохлоридом в різний час доби

умови експерименту	площа перетину ядер пінеалоцитів епіфіза, мкм ²	діаметр ядер нейронів супрахіазматичного ядра гіпоталамуса, мкм	діаметр ядер нейронів аркуатного ядра гіпоталамуса, мкм	діаметр ядер нейронів паравентрикулярного ядра гіпоталамуса, мкм	висота тироцитів щитоподібної залози, мкм	внутрішній діаметр фолікулів щитоподібної залози, мкм
ранкове введення препаратів						
фізіологічний розчин	19,8±0,7	7,2±0,2	7,7±0,1	7,2±0,6	5,2±0,2	42,0±0,7
мелатонін	19,1±0,2	8,0±0,1*	7,9±0,2	6,5±0,4	5,0±0,1	38,0±1,0*
R(+)-SCH-23390	18,8±0,4	7,0±0,1	6,7±0,1*	8,6±0,3	4,2±0,1*	38,1±1,7*
R(+)-SCH-23390 + мелатонін	19,4±0,6	8,2±0,1*	7,2±0,1*^	7,6±0,3^	4,6±0,1*^	30,2±0,9*^
денне введення препаратів						
фізіологічний розчин	18,8±0,3	7,7±0,1	7,9±0,1	6,7±0,5	5,3±0,2	41,2±1,0
мелатонін	20,3±0,4*	8,6±0,1*	7,4±0,1*	8,6±0,4*	4,9±0,1	39,8±1,0
R(+)-SCH-23390	17,6±0,4*	7,3±0,1*	7,1±0,1*	7,8±0,3	4,6±0,1*	22,7±0,6*
R(+)-SCH-23390 + мелатонін	21,5±0,5*	8,6±0,1*	7,4±0,1*	6,9±0,3^	5,6±0,1^	29,1±0,9*^
вечірнє введення препаратів						
фізіологічний розчин	20,3±0,4	8,7±0,1	7,8±0,1	7,9±0,4	5,1±0,2	37,3±0,9
мелатонін	23,6±0,4*	9,5±0,1*	8,8±0,1*	9,1±0,6	5,5±0,2	38,2±1,0
R(+)-SCH-23390	19,3±0,3*	7,4±0,1*	7,6±0,1	7,8±0,4	6,5±0,1*	35,3±1,1
R(+)-SCH-23390 + мелатонін	16,5±0,4*^	7,2±0,1*^	7,0±0,1*^	5,8±0,3*^	6,4±0,1*^	36,4±1,0
нічне введення препаратів						
фізіологічний розчин	18,7±0,4	8,5±0,1	7,2±0,1	9,1±0,5	5,7±0,1	35,3±0,7
мелатонін	23,2±0,4*	8,5±0,2	7,6±0,1*	6,3±0,4*	6,3±0,2*	34,7±0,8
R(+)-SCH-23390	18,9±0,4	7,3±0,1*	7,1±0,1	6,0±0,3*	6,7±0,1*	35,6±0,9
R(+)-SCH-23390 + мелатонін	22,1±0,6*	8,8±0,1	7,4±0,1	7,3±0,3*	6,7±0,2*	38,1±1,2*^

* – P<0,05 (порівняно з відповідним параметром у контрольній групі в той же час доби).

^ – P<0,05 (порівняно з відповідним параметром у групі, якій вводили лише мелатонін в той же час доби).

Ранкове введення мелатоніну після блокади дофамінових D1-рецепторів R(+)-SCH 23390 гідрохлоридом не веде до достовірних змін морфометричних параметрів циркадної системи порівняно з введенням мелатоніну без блокади дофамінових D1-рецепторів (табл. 1). Діаметр нейронів паравентрикулярного ядра після ранкового введення мелатоніну на фоні заблокованих R(+)-SCH 23390 гідрохлоридом дофамінових D1-рецепторів є проміжним порівняно з вищезазначеним параметром у птахів, що отримували мелатонін і у птахів, що отримували R(+)-SCH 23390 гідрохлорид (табл. 1). Це може бути пояснено простою сумациєю ефектів від введення цих двох біологічно активних речовин. Зниження діаметра ядер нейроцитів аркуатного ядра у птахів, що отримували мелатонін після блокади дофамінових D1-рецепторів R(+)-SCH 23390 гідрохлоридом порівняно з птахами, що отримували лише мелатонін (табл. 1) може бути пояснене гальмівним впливом блокади дофамінових

D1-рецепторів, оскільки введення R(+)-SCH 23390 гідрохлориду в цей час доби знижує діаметр нейроцитів аркуатного ядра. Аналогічно гальмівним ефектом введення блокатора дофамінових D1-рецепторів R(+)-SCH 23390 гідрохлориду може бути пояснене достовірне зниження висоти тироцитів щитоподібної залози у перепелів, що отримували мелатонін після введення R(+)-SCH 23390 гідрохлориду порівняно з перепелами, що одержували тільки мелатонін. Також кумулятивним гальмівним ефектом можна пояснити і зниження внутрішнього діаметра фолікулів у щитоподібній залозі після ранкового введення мелатоніну разом з блокатором дофамінових D1-рецепторів R(+)-SCH 23390 гідрохлоридом, оскільки як введення мелатоніну, так і введення R(+)-SCH 23390 гідрохлориду в цей час доби веде до зниження цього морфометричного параметра (табл. 1). Отже, вранці ефекти мелатоніну на циркадну та гіпоталамо-тиреоїдну системи мабуть не

реалізуються через дофамінергічну систему головного мозку із залученням D1-рецепторів.

Вдень блокада дофамінових D1-рецепторів R(+)-SCH 23390 гідрохлоридом не змінює стимулюючого впливу мелатоніну на пінеалоцити епіфіза та нейрони супрахіазматичного й аркуатного ядер гіпоталамуса (табл. 1). Проте неоднозначними є дані стосовно впливу денного введення мелатоніну та R(+)-SCH 23390 гідрохлориду на діаметр нейронів паравентрикулярного ядра та на висоту тироцитів щитоподібної залози. Так, стимулюючий ефект мелатоніну на діаметр нейронів паравентрикулярного ядра змінюється на гальмівний при введенні мелатоніну на фоні блокуваних R(+)-SCH 23390 гідрохлоридом дофамінових D1-рецепторів, хоча саме по собі введення R(+)-SCH 23390 гідрохлориду не має достовірного ефекту (табл. 1). Висота тироцитів не змінюється після денного введення мелатоніну, знижується після денного введення R(+)-SCH 23390 гідрохлориду, проте зростає після введення мелатоніну і R(+)-SCH 23390 гідрохлориду разом (табл. 1). Отже, дофамінові D1-рецептори частково задіяні в реалізації впливу мелатоніну на деякі морфометричні параметри гіпоталамо-тиреоїдного комплексу в денний час доби.

ВИСНОВКИ

Таким чином, дофамінергічна система головного мозку може бути задіяна з залученням D1-рецепторів до реалізації ефектів мелатоніну на центральні структури гіпоталамо-тиреоїдного комплексу ввечері, а на саму щитоподібну залозу – вночі. Крім того, частина ефектів мелатоніну на гіпоталамо-тиреоїдну систему в денні години доби також може бути опосередкована дофамінергічною системою головного мозку із залученням D1-рецепторів. Вранці ж дофамінові D1-рецептори очевидно не залучені до впливу мелатоніну на гіпоталамо-тиреоїдну та циркадну системи птахів.

Література

1. Арушанян Э.Б. К фармакологии мелатонина // Экспериментальная и клиническая фармакология.– 1992.– Т. 55, № 5.– С. 72-77.
2. Микроскопическая техника / под ред. Д.С. Саркисова, Ю.Л. Перова.– М., 1996.
3. Bartell P.A., Miranda-Anaya M., McIvor W., Menaker M. Interactions between dopamine and melatonin organize circadian rhythmicity in the retina of the green iguana // J. Biol. Rhythms.– 2007.– Vol. 22, № 6.– P. 515-523.
4. Gesing A., Jagiela J., Lewinski A. Effects of melatonin on the process of apoptosis in rat thyroid follicular cells // Neuroendocrinol. Lett.– 2006.– Vol. 27, № 1-2.– P. 81-84.
5. Hanon E.A., Routledge K., Dardente H., Masson-Pevet M., Morgan P.J., Hazlerigg D.G. Effect of photoperiod on the thyroid-stimulating hormone neuroendocrine system in the European hamster (*Cricetus cricetus*) // J. Neuroendocrinol.– 2010.– Vol. 22, № 1.– P. 51-55.
6. Milne J.A., Loudon A.S., Sibbald A.M., Curlewis J.D., McNeilly A.S. Effects of melatonin and a dopamine agonist and antagonist on seasonal changes in voluntary intake, reproductive activity and plasma concentrations of prolactin and triiodothyronine in red deer hinds // J. Endocrinol.– 1990.– Vol. 125, № 2.– P. 241-249.
7. Kundurovic Z., Sofic E. The effects of exogenous melatonin on the morphology of thyrocytes in pinealectomized and irradiated rats // J. Neural. Transm.– 2006.– Vol. 113, № 1.– P. 49-58.
8. Mazzocchi G., Carughi S., Sperandeo M., Pazienza V., Giuliani F., Tarquini R. Neuro-endocrine correlations of hypothalamic-pituitary-thyroid axis in healthy humans // J. Biol. Regul. Homeost. Agents.– 2011.– Vol. 25, № 2.– P. 249-257.
9. Revel F.G., Saboureaux M., Pevet P., Mikkelsen J.D., Simonneaux V. Melatonin regulates type 2 deiodinase gene expression in the Syrian hamster // Endocrinology.– 2006.– Vol. 147, № 10.– P. 4680-4687.
10. Zisapel N. Melatonin-dopamine interactions: from basic neurochemistry to a clinical setting // Cell. Mol. Neurobiol.– 2001.– Vol. 21, № 6.– P. 605-616.

ВЛИЯНИЕ МЕЛАТОНИНА НА ГИПОТАЛАМО-ТИРЕОИДНУЮ СИСТЕМУ ПТИЦ: ЭФФЕКТ БЛОКАДЫ ДОФАМИНОВЫХ d1-РЕЦЕПТОРОВ

Нужина Н.В., Варенюк И.Н., Орлова Н., Дзержинский Н.Э.

Цель данного исследования – выяснить возможность привлечения дофаминовых D1-рецепторов к возможному участию дофаминэргической системы головного мозга в реализации эффектов мелатонина на гипоталамо-тиреоидную систему у птиц в разное время суток. Для этого японским перепелам утром, днем, вечером или ночью однократно вводили физиологический раствор (контрольная группа), мелатонин, блокатор дофаминовых D1-рецепторов R(+)-SCH 23390 гидрохлорид, или мелатонин после блокады D1-рецепторов. Показано, что в определенные периоды суток влияние мелатонина на морфометрические параметры пінеалоцитов эпіфіза, нейроцитов гіпоталамічних ядер (супрахіазматического, аркуатного, паравентрикулярного) и щитовидной железы после блокады D1-рецепторов отличается от влияния самого мелатонина, и эта разность не может быть объяснена простой суммацией эффектов. А поэтому сделан вывод, что у птиц дофамин через D1-рецепторы может опосредовать эффекты мелатонина на центральные гипоталамические структуры гипоталамо-тиреоидного комплекса вечером, а на саму щитовидную железу – днем и ночью, и не задействован в другое время суток.

Ключевые слова: мелатонин, дофаминовые рецепторы, R(+)-SCH 23390 гидрохлорид, щитовидная железа, гипоталамус, эпифиз, птицы.

INFLUENCE OF MELATONIN ON HYPOTHALAMIC-THYROID SYSTEM IN BIRD: A EFFECT OF BLOCKADE OF DOPAMINERGIC D1-RECEPTORS

Nuzhyna N.V., Vareniuk I.M., Orlova N., Dzerzhynsky M.E.

A check of possibility the brain dopaminergic system to mediate the influence of melatonin on hypothalamic-pituitary-thyroid axis in bird through D1-receptors was an aim of this study. Japanese quails were treated with a single dose of physiology solution (control group), melatonin, R(+)-SCH 23390 (blocker of dopamine D1-receptors), or melatonin after R(+)-SCH 23390 in four times of day (in the morning, in the day, in the evening, or at the night). It was shown that morphometrical data of pinealocytes, neurones of arcuate, paraventricular and suprachiasmatic hypothalamic nuclei, thyrocytes and follicles of thyroid gland after injection of melatonin without D1-blocker and after injection of melatonin with R(+)-SCH 23390 is different. This difference in hypothalamic nuclei in the evening and in thyroid gland at the night and in the day doesn't explain the additive effect of melatonin and R(+)-SCH 23390. It was conclusion that dopamine via D1-receptors can mediate the influence of melatonin on hypothalamic-pituitary-thyroid axis in bird. This mediation was observed in hypothalamic nuclei in the evening and in thyroid gland at the night and in the day. These effects were not observed in other time of day.

Key words: melatonin, dopaminergic receptors, R(+)-SCH 23390, thyroid gland, hypothalamus, pineal gland, bird.



УДК 577.1

СТАН АНТИОКСИДАНТНОЇ СИСТЕМИ І ПРОЦЕСІВ ПОЛ ПРИ ЗЛОЯКІСНОМУ РОСТІ У ЩУРІВ З РЕЗИСТЕНТНОЮ ФОРМОЮ КАРЦИНОМИ ГЕРЕНА ЗА УМОВ ВЕДЕННЯ «ГРІНІЗАЦІЯ ГРІН R»

Раєцька Я.Б., Строцька Є.А., Хіміч М.В., Преображенська Т.Д., Остапченко Л.І.

Інститут біології, Київського національного університету імені Тараса Шевченка, Київ, Україна,
e-mail: mykolah@rambler.ru

Надійшла до редакції 03.06.2011

Показано, що наявність в організмі злоякісних новоутворень призводить до суттєвого порушення окислительно-антиоксидантного гомеостазу (посилення процесів перекисного окислення ліпідів та зміни функціонування антиоксидантної системи). Експериментальне застосування препарату «Грінізація ГРІН R» призводить до нормалізації показників вільнорадикального окислення ліпідів та активації антиоксидантних процесів, що передбачає розгляд препарату в якості потенційного антиоксидантного засобу з протипухлинною дією.

Ключові слова: перекисне окислення ліпідів, каталаза, супероксиддисмутаза, біологічно активні речовини, резистентність, карцинома Герена.

ВСТУП

Вивчення біохімічних механізмів злоякісного росту з виявленням можливих підходів до його корекції за допомогою біологічно активних речовин становить один з провідних напрямків комплексних онкологічних досліджень. Злоякісні пухлини розвиваються на фоні перебудови нейрогуморального й метаболічного статусу організму [1,2]. Характер і спрямованість злоякісного процесу в значній мірі визначаються станом реактивності організму. Процеси вільнорадикального окиснення ліпідів займають важливе місце при розвитку пухлини [3,4]. Проходження реакцій вільнорадикального окиснення в ліпідному субстраті сприяє утворенню різноманітних продуктів перекисного окислення ліпідів (ПОЛ), які здатні гальмувати проліферативну активність клітин. Зниження концентрації вільних радикалів призводить до прискорення клітинного поділу. Значну роль у регуляції ПОЛ відіграють інгібітори вільнорадикальних реакцій - антиоксиданти. Високий рівень антиоксидантів у тканинах пухлини сприяє їх проліферативній активності. В умовах злоякісного росту пухлина інтенсивно накопичує біоантиоксиданти з крові, забезпечуючи тим самим умови для подальшої пухлинної прогресії і росту. При цьому ресурси фізіологічної антиоксидантної системи (ФАОС) виснажуються, протипухлинна реактивність організму знижується, що є передумовою подальшого пухлинного росту. Вищевикладене дає підстави вважати, що показники ПОЛ і активності антиоксидантних систем (АО-систем) захисту дають важливу інформацію про перебіг злоякісного процесу й важкість стану організму пухлиноносія [6].

На сьогоднішній день експериментальними і клінічними спостереженнями переконливо доведена перспективність використання засобів природного походження в комбінованій терапії онкологічних захворювань [4,5,15]. Дуже часто основною причиною терапевтичних невдач у лікуванні хворих на рак є формування резистентності пухлин до різних хіміопрепаратів. Тому особливий інтерес викликають препарати, що підвищують протипухлинну резистентність, що перешкоджають розвитку метастазів і рецидивів пухлин, що знижують токсичні прояви хіміотерапії. Крім класичної фітотерапії, де використовуються окремі рослини, на основі трав'яних зборів нині у світі випускається близько 1200 харчових добавок (БАД), які широко застосовуються в комплексному лікуванні і для профілактики захворювань. Отже, застосування препаратів здатних нормалізувати стан фізіологічної антиоксидантної системи і підвищити здатність організму протистояти пухлинному процесу є важливим для онкології [3,4,14].

Одним з таких препаратів є «Грінізація Грін R» - розроблений компанією «Ворлд грінізейшен систем» Україна, представляє собою порошкову форму очищених білкових фракцій голотурії далеосхідної і вермікультури, зроблених по спеціальній технології (не ферментативній, багатоступінчатій, низькотемпературній), що дозволяє уникнути денатурації білків, збільшити їх біодоступність, зберегти глобулярний стан з повним збереженням регуляторних пептидів ядерних ДНК та їх функціональних якостей.

Метою нашої роботи було дослідження показників ПОЛ і ферментів антиоксидантної системи

в органах (головному мозку, печінці та селезінці) тканині шурів з резистентною карциномою Герена у динаміці її росту за умов введення «Грінізація Грін R».

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Досліди проводились на 100 білих лабораторних щурах-самках масою 180 ± 20 г, яких утримували на стандартній дієті віварію. Тваринам трансплантували резистентну карциному Герена шляхом підшкірної ін'єкції у ділянку стегна задньої кінцівки 20%-ної суспензії пухлинних клітин на 0,9%-ному розчині NaCl, отриманих від щурів-донора [1,2] (штам пухлини наданий Інститутом експериментальної патології, онкології та радіобіології ім. Р.Кавецького НАН України). Частини тварин щоденно протягом 21-ї доби після прищеплення пухлини вводили дослідний препарат в різних дозах. Піддослідні тварини були розділені на 4 групи: 1 - контроль, інтактні щури, що отримували розчин NaCl - 1 мл.; 2 - щури з прищепленою резистентною карциномою Герена, що отримували розчин NaCl - 1 мл.; 3 - щури з прищепленою резистентною карциномою Герена, що отримували препарат в дозі 90 мг/кг; 4 - щури з прищепленою резистентною карциномою Герена, що отримували препарат в дозі 136 мг/кг.

Тварин під легким ефірним наркозом декапітували через 21 добу після перевивання пухлин.

Вміст білка у гомогенатах оцінювали з використанням методу Грінберга [7]. Вміст вторинних продуктів ПОЛ оцінювали у реакції з тіобарбітуровою кислотою згідно (ТБК) [8]. Активність каталази визначали згідно [9] за калібрувальною кривою з використанням препарату каталази еритроцитів бика

(“Sigma”, США). Активність загальної супероксиддисмутази (СОД) оцінювали за методом, описаним у роботі [10] за здатністю ферменту конкурувати з нітросинім тетразолієм за супероксид-аніон, який генерується в результаті взаємодії НАДН та феназинметасульфату.

Статистичну обробку отриманих результатів проводили з використанням програми OriginLab 8.0. Зміни показників вважали достовірними при $p < 0,05$; при $p > 0,05$ зміни враховували як тенденцію [11].

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Сьогодні відомо патогенетичне значення інтенсифікації процесів ПОЛ і зниження антиоксидантної активності при онкологічних захворюваннях. Так, у ряді біохімічних досліджень показано зростання ПОЛ при злоякісному рості [12,13]. У основі розвитку ланцюгових вільнорадикальних реакцій лежить порушення рівноваги між антиоксидантними та прооксидантними системами організму. Антиоксидантна система захисту організму контролює і гальмує всі етапи вільнорадикальних реакцій, починаючи від їх ініціації і закінчуючи утворенням гідроперекисів та МДА.

Проведено дослідження інтенсивності вільнорадикального окиснення ліпідів та активності антиоксидантних ферментів – супероксиддисмутази і каталази - у тканинах печінки, селезінки та мозку шурів з резистентною формою карциноми Герена за дії препарату «Грінізація ГРІН R» у дозах 90 та 136 мг/кг.

Таблиця 1

Вміст ТБК-активних продуктів в гомогенаті різних органів (нмоль/мг білка) у шурів з резистентною карциномою Герена за умов введення «Грінізація Грін R».

Групи тварин, умови досліджу	ТБК, нмоль/мг		
	Печінка	Селезінка	Мозок
Контроль	78,47 $\pm$ 2,78	67,29 $\pm$ 2,29	58,8 $\pm$ 1,69
РКГ	256,62 $\pm$ 27,56*	190,3 $\pm$ 27,21	97,61 $\pm$ 10,27*
РКГ + 90мг/кг	176,52 $\pm$ 3,43*	126,49 $\pm$ 26,38	115,08 $\pm$ 2,09*
РКГ + 136мг/кг	112,88 $\pm$ 10,21*	117,85 $\pm$ 38,04	101,03 $\pm$ 10,43*

Примітка: РКГ - резистентна карцинома Герена

* - вірогідні зміни порівняно з РКГ тваринами ($p < 0,05$).

Відмічено зростання вмісту тіобарбітурат-активних продуктів (ТБАП) у печінці, селезінці та мозку шурів за росту резистентної карциноми Герена у 2-3 рази у порівнянні з інтактним контролем (табл. 1). Встановлено, що препарат «Грінізація ГРІН R» призводить до зниження інтенсивності ліпопероксидації в печінці та селезінці шурів. Так, препарат у дозі 90 мг/кг виявляв активність по відношенню до резистентної форми карциноми Герена, знижуючи вміст ТБАП в печінці шурів з карциномою у 1,9 рази, у селезінці в 1,5 рази у порівнянні з селезінкою шурів з пухлинами.

Показано, що препарат у дозі 136 мг/кг призводить до ще більшого зниження вмісту продуктів ПОЛ, як печінці так і в селезінці шурів з резистентною пухлиною порівняно з групою шурів з резистентною карциномою, які не отримували препарату. Відмічено, що досліджуваний препарат майже не вплинув на вміст ТБК-АП в тканинах головного мозку. Таким чином, препарат «Грінізація ГРІН R» більш ефективно сприяє зниженню інтенсивності ПОЛ в печінці та селезінці шурів при застосуванні вищої дози препарату. Однак отримані показники вмісту продуктів ПОЛ у печінці та селезінці шурів з

пухлинами були достовірно вищими від контрольних значень.

Відомо, що порушення інтенсивності ПОЛ в результаті злоякісного росту супроводжувалося

змінами активності ферментів антиоксидантної системи, тому наступним етапом нашої роботи було дослідження активності супероксиддисмутази та каталази [4,12].

Таблиця 2

Активність СОД ум. од. / (мг білку * хв.) у гомогенатах печінки, селезінки та мозку, нирок у щурів з резистентною карциномою Герена за умов введення «Грінізація Грін R».

Групи тварин, Умови досліджу	СОД, у.о./мг білка		
	Печінка	Селезінка	Мозок
Контроль	2,49±0,05	1,51±0,04	1,9±0,03
РКГ	1,47±0,02*	0,82±0,05*	1,43±0,05*
РКГ + 90мг/кг	1,66±0,25*	0,77±0,04*	1,32±0,09
РКГ + 136мг/кг	1,69±0,02*	1,20±0,14*	1,5±0,09

Дані по активності загальної супероксиддисмутази (СОД), відображені в табл. 2, вказують на те, що ріст злоякісних пухлин супроводжується зниження активності даного ферменту в 1,5-2 рази у всіх досліджуваних органах щурів порівняно з інтактними тваринами. Введення препарату «Грінізація ГРІН R» у дозі 90 мг/кг призводило до незначного зростання активності СОД лише в печінці щурів з резистентною карциномою Герена. Продемонстровані в таблиці результати вказують на те, що у вищій дозі препарат «Грінізація

ГРІН R» сприяє підвищенню активності СОД в усіх досліджуваних органах щурів з резистентною формою порівняно групою яким не вводили дослідний препарат, наближаючи показник активності до значень, які спостерігалися у контролі. Отже, препарат у обох використаних дозах обумовлює незначне зростання активності СОД в тканинах печінки, селезінки та мозку з резистентною формою карциноми Герена у порівнянні з відповідним контролем пухлинного росту.

Таблиця 3

Активність каталази мкмоль пероксиду водню/(мг білку*хв.), у гомогенатах печінки, селезінки та мозку, нирок у щурів з резистентною карциномою Герена за умов введення «Грінізація Грін R».

Групи тварин, Умови досліджу	Каталаза, у.о./мг білка		
	Печінка	Селезінка	Мозок
Контроль	192,83±45,7	119,47±9,37	135,59±8,73
РКГ	91,79±8,55	55,7±10,13*	60,68±1,56*
РКГ + 90мг/кг	218,40±8,09	100,8±65,5*	117,99±17,4
РКГ + 136мг/кг	205,22±52,3	101,61±2,61	67,85±13,9*

Активність каталази у печінці, селезінці та мозку щурів з резистентною карциномою Герена знижувалася порівняно з контрольною групою тварин в 2-2,5 рази, пов'язаного з ростом резистентної карциноми Герена. (табл. 3). Введення препарату у дозі 90 мг/кг призводить до зростання активності каталази в 1,5-2 рази у всіх досліджуваних органах щурів з резистентною пухлиною. У дозі 136 мг/кг препарат «Грінізація ГРІН R» спричинює зростання активності каталази, також призводячи до нормалізації значень даного показника.

Отже, на підставі проведених досліджень встановлено, що злоякісний ріст призводить до змін значень пероксидного окислення ліпідів. Порушення інтенсивності ПОЛ в результаті злоякісного росту супроводжувалося змінами активності ферментів антиоксидантної системи. Показано, що введення дослідного препарату сприяє нормалізації процесів пероксидації. Нами було показано, що дослідний препарат «Грінізація Грін R» проявляє значний гальмівний ефект на ріст резистентної пухлини. Отже, можна зробити висновок, за умов введення досліджуваного препарату «Грінізація Грін R» в

різних дозах прослідковувалася спільна тенденція, однак, за умов введення більшої дози препарату, вплив був ефективнішим.

ВИСНОВКИ

Встановлено, що злоякісний ріст резистентної форми карциноми Герена призводить до зростання значень пероксидного окислення ліпідів в 2-3 рази в усіх досліджуваних органах порівняно з контрольною групою.

Досліджено, що порушення інтенсивності ПОЛ в результаті злоякісного росту супроводжувалося зниженням активності ферментів антиоксидантної системи в 1,5-2,5 рази в тканинах печінки, селезінки та мозку щурів.

Показано, що введення дослідного препарату «Грінізація Грін R» сприяє нормалізації процесів пероксидації, проявляє значний гальмівний ефект на ріст резистентної пухлини. В різних дозах прослідковувалася спільна тенденція, однак, за умов введення більшої дози препарату 136 мг/кг, вплив був ефективнішим.

Література

1. *Кавецкий Р.Е.* Реактивность организма и опухолевый рост. Киев: Наук.думка, 1981. 432 с.
2. *Димант И.И., Шарипов Р.К., Муратходжаев Н.К. и др.* Окислительные процессы и опухолевый рост. Ташкент: Изд.-полиграф. объединение им. Ибн.Сины, 1992. 155 с.
3. *Raetska Ya.B., Belokon U.N., Baraboy V.A., Ostapchenko L.I.* Correction of oxidant-antioxidant homeostasis in rats with Geren carcinoma in radiotherapy // *Фізика живого*. – 2003. – Vol. 11, №1. – С.89-94.
4. *Расецкая Я.Б., Білокінь Ю.М., Прокопова К.В., Лукашкова К.В.* Оцінка дії антиоксиданту (проантоціанидину) на злоякісний ріст при променевої терапії // *Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Біологія*. – 2003. – Вип.41. – С.118-120.
5. *Amagava S., Ogihara Y.* Effects of shosaikoto, an oriental herbal medicinal mixture, on restraaml-stressed mice // *J.Ethnopharmacol.* 1990. – Vol. 28. – N 3. – P.357-363.
6. *Барабой В.А., Орел В.Э., Карнаух И.М.* Перекисное окисление и радиация. К.: Наук. думка, 1991. 256 с.
7. *Greenberg C.S., Craddock P.R.* // *Clin Chem*. – 1982. – V. 28, 7. – P. 1725-1726.
8. *Современные методы в биохимии* / Под. ред. В.Н.Ореховича. – М., 1977.
9. *Королюк М.А., Иванова Л.И., Монгарева В.Е. и др.* // *Лаб. дело*. -1988. -№ 1.- С. 16-19.
10. *Nishikimi M., Roa N.A., Yogi K.* // *J. Biochem. Biophys. Res. Commun.* -1972. – V.46. – P. 849-854.
11. *Лакін Г.Ф.* Биометрия: Учебное пособие для биол. спец. вузов- 4-е изд., перераб. и доп. М.: Высш. шк., 1990. — 352 с.: ил
12. *Димант И.И., Шарипов Р.К., Муратходжаев Н.К. и др.* Окислительные процессы и опухолевый рост. Ташкент: Изд.-полиграф. объединение им. Ибн.Сины, 1992. 155 с.
13. *Bagchi D., Garg A., Krohn R.L., Bagchi M., Bagchi D.J., Balmoori J. and Stohs S.J.* // *Gen. Pharmac.* 2005. 30, N 4. P. 1—6.
14. *Богущ Т.А., Богущ Е.А., Степанов А.А.* Современные подходы к повышению эффективности противоопухолевой терапии путем индивидуальной оптимизации лечения и избирательного снижения побочных токсических проявлений цитостатиков // *Антибиотики и химиотерапия*. 2000. Т. 45, № 1.С. 32-38.
15. *Е.Д. Гольдберг, Е.П. Зуева,* Препараты из растений в комплексной терапии злокачественных новообразований. Томск, 2000., 129с.

СОСТОЯНИЕ АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ И ПРОЦЕССОВ ПОЛ ПРИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННОМ РОСТЕ У КРЫС С РЕЗИСТЕНТНОЙ ФОРМОЙ КАРЦИНОМЫ ГЕРЕНА ПРИ УСЛОВИИ ВВЕДЕНИЯ «ГРИНИЗАЦИЯ ГРИН R»

Расецкая Я.Б., Строчкая Е.А., Химич Н.В., Преображенская Т.Д., Остапченко Л.И.

Показано, что присутствие в организме злокачественных новообразований приводит к существенному нарушению оксидантно-антиоксидантного гомеостаза (усиление процессов перекисного окисления липидов и изменения функционирования антиоксидантной системы). Экспериментальное использование препарата «Гринизация ГРИН R» приводит к нормализации показателей свободнорадикального окисления липидов и активации антиоксидантных процессов, что допускает рассмотрение препарата в качестве потенциального антиоксидантного препарата с противоопухолевым действием.

Ключові слова: перекисное окисление липидов, каталаза, супероксиддисмутаза, биологически активные вещества, резистентность, карцинома Герена.

ANTIOXIDANT SYSTEM AND PROCESSES POL MALIGNANT GROWTH IN RATS WITH RESISTANT GUERIN'S CARCINOMA WITH THE INTRODAKTION OF "GRINIZATSIYA GREENE R»

Raetska Ya.B., Strotska E.A., Khimich M.V., Preobrajenska T.D., Ostapchenko L.I.

It is shown that the presence in the body of malignant tumors leads to significant disturbance of oxidative-antioxidative homeostasis (increased lipid peroxidation and changes in the antioxidant system function). Experimental admission of the compound "Grinization Green R" leads to normalization of indicators of free radical oxidation of lipids and activation of the antioxidant processes, that predict the consideration of the compound as a potential antioxidant product with antitumor effects.

Keywords: lipid peroxidation, catalase, superoxide dismutase, biologically active substances, resistance, Guerin's carcinoma.



УДК 577.391:3116

СТАН АНТИОКСИДАНТНОЇ СИСТЕМИ КЛІТИН ПІДШЛУНКОВОЇ ЗАЛОЗИ ЗА УМОВ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО УЛЬЦЕРОГЕНЕЗУ

Вишнеvsька А.Г., Ковальова В.А., Гайда Л.М., Остапченко Л.І.

ННЦ «Інститут біології» (біологічний факультет Київського національного університету імені Тараса Шевченка), Київ, Україна

e-mail: alina.vishnevskaya@gmail.com

Надійшла до редакції 04.05.2011

Було проведено дослідження стану антиоксидантної системи клітин підшлункової залози за умов етанолової та стресової експериментальних моделей виразки шлунка у щурів. Встановлено зниження активності супероксиддисмутази та каталази, та підвищення активності глутатіонтрансферази та глутатіонпероксидази.

Ключові слова: виразка шлунка, підшлункова залоза, антиоксидантна система.

ВСТУП

Як свідчить статистика, за останні роки рівень поширеності патологій шлунково-кишкового тракту в Україні зріс більш ніж на 24%, а рівень захворюваності — на 8,7%. Ерозивно-виразкові захворювання гастродуоденальної зони найбільш часто зустрічаються у терапевтичній та гастроентерологічній практиці, а захворюваність виразковою хворобою шлунка та ДПК також виявляє тенденцію до росту, що привернуло увагу медичної спільноти до цієї проблеми [1].

У зв'язку з поширеністю захворювання, труднощами діагностики, тяжкістю можливих ускладнень, складностями профілактики і лікування виразкової хвороби варто розглядати як одну з найбільш актуальних проблем сучасної гастроентерології.

Виразкова хвороба шлунка — це хронічне, циклічне захворювання, в основі якого лежить запалення слизової оболонки шлунка, погіршення кровопостачання та утворення виразок у періоди загострення.

Необхідно розглядати виразкову хворобу з позицій системних захворювань, в основі яких лежить ураження всіх органів системи травлення, а також нервової, гуморальної, імунної та інших систем організму.

Ураження печінки й підшлункової залози при виразковій хворобі шлунка й дванадцятипалої кишки практично не визначаються методами клінічно-лабораторної діагностики, в той час як морфологічні зміни в цих органах розвиваються вже на ранніх стадіях захворювання [3]. Гістологічно було доведено залучення підшлункової залози до процесів ультрогенезу. Тому необхідне більш детальне вивчення процесів, що відбуваються у підшлунковій залозі за умов розвитку виразки шлунка

Виразкова хвороба шлунка належить до патологій, які супроводжуються процесами активації

перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ), гіперпероксидації[4].

Активация процесів вільнорадикального окиснення ліпідів супроводжується накопичення продуктів ПОЛ, що пошкоджують структури мембран епітеліальних клітин слизової оболонки шлунка та впливають на стан вбудованих у них мембранних комплексів [5].

Внаслідок активації процесів пероксидації змінюється білково-ліпідне співвідношення, що сприяє структурно-функціональним змінам у клітині.

Вважається, що порушення динамічної рівноваги в системі ПОЛ —антиоксидантна активність є важливою патогенетичною ланкою в розвитку виразкової хвороби, хоча не можна виключити й те, що воно може бути і її наслідком. Загальна система регуляції гомеостазу організму охоплює всі рівні фізіологічної організації біологічної системи, й тому важко виявити місце локалізації порушення, яке в подальшому призводить до виразки шлунка [6].

До числа антиоксидантних ферментів відносяться супероксиддисмутаза (СОД), що інактивує супероксидний аніон-радикал; каталаза, що каталізує реакцію розкладу перекису водню H_2O_2 , а також ферменти системи глутатіону (Г-SH): глутатіонпероксидаза (ГПО), що каталізують розпад поряд з H_2O_2 також органічних (ліпідних) перекисів, глутатіонредуктаза (ГР), що відновлює глутатіон, окиснений у ході ферментативних (ГПО) і неферментативних реакцій, і сімейство глутатіонтрансфераз (ГТ), що алкілюють глутатіоном різноманітні токсичні метаболіти [7].

В результаті наших попередніх досліджень було встановлено зростання рівня продуктів ПОЛ (шифових основ, малонового діальдегіду, дієнових кон'югатів) у клітинах підшлункової залози за умов експериментальної виразки шлунка. Такі результати

можуть свідчити про зниження активності антиперекисних систем.

Метою даної роботи було визначити активність антиоксидантних ферментів (СОД, каталази та ферментів системи глутатіону) в клітинах підшлункової залози щурів за умов етанолової та стресової експериментальних моделей виразки шлунка у щурів.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Дослідження проводили на білих нелінійних щурах, віком 2-3 місяці вагою близько 200 г. Щурів утримували на стандартному раціоні віварію. За добу проведення дослідів щури мали доступ лише до води. Для моделювання виразки шлунка було обрано стресову та етанолову моделі. Стресову виразку шлунка створювали методом “соціального іммобілізаційного стресу” в модифікації [8]. Щурів розміщували в металевих перфорованих патронах з скляним вікном в донній частині, де розміщується голова щура. Патрони з тваринами розташовували в колонії вільноживучих щурів, яким створювали умови для їх природного існування (освітлення, вода, корм). Через 24 години щурів виймали з патронів та декапітували. Етанолові нейродистрофічні ураження слизової оболонки шлунка отримували за методом Окабе [9]. Для цього голодним щурам перорально

вводили 1 мл 80% етанолу, через добу тварин декапітували. Як контроль використовували здорових щурів. Розрізали шлунок по малій кривизні, вивертати назовні, промивали фізіологічним розчином, за допомогою гастроскопу при трансліюмінаційному освітленні досліджували стан слизової оболонки шлунка.

Активність СОД та каталази визначали спектрофотометрично за методами [10] та [11]. Активність глутатіонпероксидази (ГП) визначали за кількістю непрореагуваного з перекисом водню окисненого глутатіону, вміст якого визначали за допомогою реактива Елмана [12]. Активність глутатіонтрансферази (ГТ) оцінювали за швидкістю утворення кон'югату з 1-хлор-2,4-динітробензолом [13]. Активність всіх ферментів перераховували на мг білку. Статистичну обробку результатів проводили використовуючи т-критерій Ст'юдента.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

В результаті наших досліджень активність каталази в клітинах підшлункової залози при етаноловій моделі виразки знижується у 1,9 рази. При ерозивно-виразкових ушкодженнях слизової викликаних стресом активність СОД і каталази клітин підшлункової залози знижується у 1,3 та у 1,7 рази відповідно (табл. 1).

Таблиця 1

Активність СОД та каталази у клітинах підшлункової залози за умов експериментального ультцерогенезу ($M \pm n$; $n=10$)

Групи тварин	СОД, ум. од. активності	Каталаза, нмоль/мг білка · хв.
Контроль	$29,5 \pm 2,4$	$8,56 \pm 0,79$
Етанолова модель	$24,7 \pm 2,3$	$4,53 \pm 0,39^*$
Стрессова модель	$23,0 \pm 1,8^*$	$5,01 \pm 0,45^*$

* $p < 0,05$ щодо контролю

Отже при етаноловій моделі виразки шлунка у клітинах підшлункової залози спостерігається зниження активності каталази при збереженні активності СОД на рівні контролю, що може призводити до надлишкового накопичення продуктів ПОЛ, так як перекис водню, продукований в наслідок ферментативної реакції, яку каталізує СОД, не може повністю розщеплюватись, тому що активність каталази знижена, порівняно з контролем.

Проведено дослідження активності ферментів системи глутатіону. Глутатіонзалежні ферменти, такі як глутатіонтрансфераза є ключовими у механізмах захисту клітин від екзогенних та ендогенних токсичних сполук та вільних радикалів, які виникають у відповідь на пошкодження клітини. Узгоджена робота глутатіонпероксидази ті глутатіонтрансферази попереджує у подальшому прогресування пероксидації, накопичення вторинних метаболітів.

Встановлено, підвищення активності ГП у 1,5 рази за умов етанолової моделі, та у 1,7 рази за умов стресової виразки шлунка (табл. 2). Це може бути пов'язано з виснаженням компенсаторних реакцій, направлених на нормалізацію процесів перекисного окиснення ліпідів та білків.

Відновлення пероксиду водню та органічних гідроперексидів – це головна функція глутатіонпероксидази. Однак, треба зауважити, що метаболізуючи ROOH, глутатіонпероксидаза може попереджувати накопичення вторинних продуктів пероксидації, але вона не здатна знешкодити їх на відміну від глутатіонтрансферази. Глутатіонтрансфераза успішно метаболізує шляхом кон'югації з GSH вторинні метаболіти.

Глутатіонтрансфераза – універсальний фермент, який шляхом трансформації нековалентних взаємодій та ковалентного зв'язування запобігає пошкодженню ДНК та мітохондрій від реактивних метаболітів і в результаті значно збільшують стійкість клітин і організму в цілому.

Нами було встановлено зростання активності ГТ у 1,5 рази у клітинах підшлункової залози за умов етанолової моделі виразки шлунка.

Зростання активності ГТ можна розглядати як адаптаційну реакцію, направлену на посилення зв'язування токсичних сполук, що утворюються внаслідок дії активних радикалів.

Таблиця 2

Активність ферментів системи глутатіону (ГП, ГТ) у цитозолі клітин підшлункової залози щурів за умов експериментальної виразки (M±m, n=10)

Групи тварин	Глутатіонпероксидаза, мкмоль GSSG/мг білка *хв	Глутатіонтрансфераза, нмоль GSSG/мг білка *хв
Контроль	2,1±0,2	86,5 ±11
Етанолова модель	3,2±0,3*	133,3±10*
Стрессова модель	3,6±0,4*	88,5±14

*p<0,05 щодо контролю

Таким чином, встановлено зміну активності антиоксидантних ферментів порівняно з контролем у клітинах підшлункової залози за умов етанолової та стресової експериментальних моделей виразки шлунка у щурів.

ВИСНОВКИ

Отримані результати свідчать про те, що за умов експериментальної виразки шлунка відбувається порушення функціонування антиоксидантної системи, що призводить до надлишкового утворення продуктів перекисного окиснення.

Література

1. Свінцицький А.С. Діагностика та лікування поширених захворювань органів травлення // Київ, ТОВ «ДЕГ ЛТД». — 2004. — 240 с.
2. Ostrovskii VK, Makovkin VV, Gerasimov VN. Pancreatic tissue heterotopy in the stomach of a patient with complications due to peptic ulcerative disease - Arkh Patol. 2008 Mar-Apr;70(2):47-8.
3. Sipponen P. Peptic ulcer disease // Gastrointestinal and oesophageal pathology // Ed. by R. Whitehead: 2nd ed. London: Churchill Livingstone, 1995. — P. 512-523.
4. Щербинина М.Б. Язвенная болезнь: современный взгляд на вопросы патогенеза // Діагностика та лікування. — 2005. — С.2-13.
5. Зверихановский Р.А., Вайнштейн С.Г. Свободнорадикальное окисление липидов и антиоксидантная система в патогенезе гастродуоденальных изъязвлений (обзор) // Врачебное дело. — 1987. — № 9. — с. 42-47.
6. Dean Roger T., Fu Schanlin, Stroker R.D.M. Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation // Biochem.j. — 1997. — 324, № 1. — P.1-18.
7. Frei B., Stocker R., Ames B.N. (1988) Antioxidant defenses and lipid peroxidation in human blood plasma // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1988. — 85. — P. 9748-9752.
8. Гройсман С.Д., Каревина Т.Г. О влиянии атропина на стрессорные поражения слизистой оболочки желудка у крыс // Библ. Указ. ВИНТИ. Деп. Рукописи.- 1979.-№12.-Б/о 131.
9. Доклінічні дослідж. лік. засобів: Метод. рекомендації За ред. чл.-кор. АМН України О.В.Стефанова. // К., 2001. 528 с.
10. Чевари С., Андел Т., Штрэнгер Я. Определение антиоксидантных параметров и их диагностическое значение в пожилом возрасте // Лаб.дело.- 1991.-№10.-С.9-13.
11. Королюк М.А., Иванова Л.И., Майорова И.Г. Метод определения активности каталазы // Лаб.дело.- 1988.-№1.-С.16-19.
12. Геруш І.В., Мецишен І.В. Стан глутатіонової системи крові за умов експериментального виразкового ураження гастродуоденальної зони та дії настоянки ехінацеї пурпурової // Вісн. проблем біології та медицини. — 1998. — № 7. — С. 10-15.
13. Мецишен І.Ф. Метод определения активности глутатионтрансферазы в крови. — В кн.: Применение ферментов в медицине. — Симферополь, 1987. — 35 с.

СОСТОЯНИЕ АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ КЛЕТОК ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ УЛЬЦЕРОГЕНЕЗЕ

Вишневская А.Г., Ковалева В.А., Гайда Л.Н., Остапченко Л.И.

Было проведено исследование состояния антиоксидантной системы клеток поджелудочной железы крыс при экспериментальном ulcerогенезе. Установлено снижение активности антиоксидантных ферментов — супероксиддисмутазы и каталазы, и возрастание активности глутатионпероксидазы и глутатионредуктазы.

Ключевые слова: язва желудка, поджелудочная железа, антиоксидантная система.

ANTIOXIDANT SYSTEM OF THE PANCREATIC CELLS UNDER EXPERIMENTAL ULCERATION IN RATS

Vyshnevskaya A., Kovalyova V., Gaida, L. Ostapchenko L.

It was examined antioxidant system of the pancreatic cells under experimental ulceration in rats. It was determined decrease of antioxidant enzymes activity — SOD and catalase, and increased activity of glutathionperoxidase and glutathionreductase.

Key words: antioxidant system, gastric ulcer, pancreas.

УДК 277.3

ЦИТОТОКСИЧНИЙ ВПЛИВ НА ПУХЛИННІ КЛІТИНИ *IN VITRO* АГЕНТІВ З ПРОТИПУХЛИННИМ ТА АНТИМЕТАСТАТИЧНИМ ЕФЕКТОМ

Гарманчук Л. В., Сенчило Н.В., Нікуліна В.В., Деніс Є.О., Непийвода Х.Д.,
Ніколаєнко Т.В., Остапченко Л.І.

ІНЦ «Інститут біології» Київського національного університету імені Тараса Шевченка,
Київ Україна

Надійшла до редакції 28.08.2011

В рамках дослідження проводився *in vitro* скринінг перспективних протипухлинних агентів, окремо та в комбінованому застосуванні. Для похідних малеміду та дигідропіролу було показано цитотоксичний/цитостатичний вплив на клітинну лінію колоректальної аденокарциноми COLO-205. Біметалічний комплекс з етилендіаміном у комбінації з тейхоевою кислотою виявились виражено цитотоксичними для культури клітин MCF-7. Було відмічено, що агенти, яким властивий цитотоксичний та антиметастатичний ефект на індукованих моделях пухлин *in vivo*, подібним чином діють на пухлинні клітини *in vitro*.

Ключові слова: MCF-7 та COLO-205 клітини, цитотоксичний/цитостатичний скринінг.

ВСТУП

Відбір перспективних лікарських засобів серед агентів синтетичного та природного походження спонукає до пошуку та створення тест-систем для ефективного скринінгу та вивчення механізму впливу на біологічні об'єкти, і в першу чергу – на організм людини [1, 2]. Моніторинг речовин на культурах клітин має свої переваги, оскільки дані тест-системи можуть бути відносно легко стандартизовані, що дозволить швидко отримати попередні результати, бути економічно доцільними та не суперечать біоетичним вимогам. На початкових етапах відбору фармакологічних агентів дослідження на культурах клітин є уже практично незамінними, оскільки різноманіття перспективних біологічно активних агентів настільки широке, що визначення первинних механізмів їх впливу на лабораторних тваринах не є раціональним. Використання в якості модельних систем культур клітин, отриманих із різних тканин організму та адаптованих до штучних умов функціонування поза організмом, спрощує процедуру визначення клітинних та молекулярних мішеней впливу різних чинників мікро- та макрооточення. Тому, мета даної роботи полягала у використанні культивованих пухлинних клітин для проведення скринінгу агентів з протипухлинним та антиметастатичним ефектом на моделях індукованого канцерогенезу *in vivo*.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Клітинні лінії та моделі. COLO-205-колоректальна аденокарцинома людини [3] MCF-7-аденокарцинома

молочної залози людини [4], люб'язно надані доктором І.Гутом (Лондонський університет).

Агенти: похідне малеміду – 1-(4-СІ-бензил)-3-СІ-4-(CF₃-феніламіно)-1Н-пірол-2,5-діон (надалі МІ1), похідне дигідропіролу – 1,4-заміщений 5-аміно-1,2-дигідропірол-3-он (надалі Д1) [5, 6] та комплекси металів з органічними лігандами: [Cu(en)₂][Cd₂(CH₃COO)₆] (PO244), ([Cu(en)₂ZnCl₄]·dmsO) (PO39), ([Cu(en)₂Zn(CH₃COO)₄] (PO80), ([Cu(en)₂CdBr₄]·dmsO) (PO252), де en - етилендіамін, dmsO - диметилсульфоксид, dmf – диметилформамід [7]. Також було використано для дослідження компонент бактеріальної стінки грам позитивних мікроорганізмів тейхоеву кислоту (ТК), очищену із *St. aureus* [8]. Цитотоксичність похідних малеміду та дигідропіролу, комплексів металів з органічними лігандами, а також ТК визначали на лініях клітин з використанням МТТ-колориметричного тесту та рутинним підрахунком співвідношення живих та мертвих клітин, за забарвленням останніх трипановим синім.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

В порівняльному цитотоксичному/цитостатичному скринінгу МІ1 та Д1 на лінії клітин колоректального раку людини COLO-205 було показано, що більшу ефективність проявляє МІ1 (рис.1). Як свідчать наведені дані як для МІ1 так і для Д1 у діапазоні концентрацій від $3,91 \times 10^{-5}$ до 1,25мМ, властивий достовірний цитотоксичний/цитостатичний ефект. У зразках клітин, що інкубувались з агентами спостерігалось зменшення кількості клітин на 10-50 % (рис 1), порівняно з відповідним контролем.

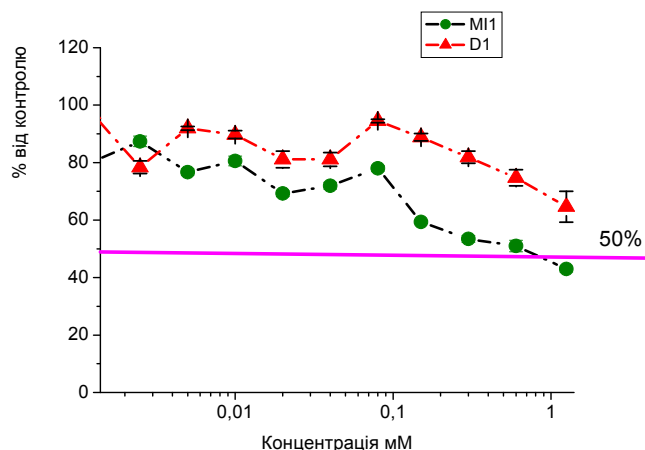


Рис.1. Криві виживаності (% від контролю) пухлинних клітин COLO-205 під впливом похідного малеміду (MI1) та дигідропіролу (D1).

Виражений цитотоксичний/цитостатичний вплив досліджуваних речовин на культуру клітин людської колоректальної аденокарциноми відповідає результатам досліджень з використанням ДМГ-індукованої моделі колоректального раку у щурів [6].

В наступній серії експериментів було досліджено цитотоксичний/цитостатичний вплив низки комплексів металів з органічними лігандами по відношенню до клітин MCF-7. Для даних сполук, раніше нами на перещеплюваній моделі карциноми легень Льюїс було зафіксовано протипухлинний та антиметастатичний ефект, який був найбільш виражений для сполуки PO244 [7]. Так, було виявлено, що в 50% тварин відсутні пухлини; в 63% тварин – метастази, порівняно з контролем. У тварин з експериментальної групи, у яких було виявлено пухлини, гальмування їх росту визначено за співвідношенням об'ємів пухлин цієї групи відносно контрольної, згідно формули $(V_k - V_e)/V_k \times 100\%$. Цей показник становив 64,7%, і достовірно ($p < 0,001$) відрізнявся від контролю. Що стосується метастазування, то відсоток тварин з метастатичним ураженням в експериментальній групі становив лише 37,5% відносно контрольної групи тварин. Окрім того, у тварин експериментальної групи, в якій виявлено метастази, їх об'єм становив $5,75 \pm 0,57 \text{ мм}^3$ проти $12,42 \pm 1,72 \text{ мм}^3$ в контролі, що було в 2 рази меншим ($p < 0,001$). В результаті проведеного скринінгу в системі *in vitro* на клітинній лінії MCF-7 за кривими виживаності клітин порівняно з контролем (рис.2) було виявлено, що показник IC_{50} для сполуки PO244 становив $1,1 \pm 0,004 \times 10^{-5} \text{ М}$, в той час як IC_{50} для сполук PO39 ($[\text{Cu}(\text{en})_2\text{ZnCl}_4] \cdot \text{dmsO}$), PO172 ($[\text{Cu}(\text{en})_2\text{ZnCl}_4] \cdot \text{dmf}$), PO80 ($[\text{Cu}(\text{en})_2\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_4]$), PO252 ($[\text{Cu}(\text{en})_2\text{CdBr}_4] \cdot \text{dmsO}$), були на порядок вищими і становили $3,25\text{--}9,7 \times 10^{-4} \text{ М}$.

Крім того на моделі експериментального канцерогенезу було визначено, що застосування PO244 з ТК може бути ефективною схемою

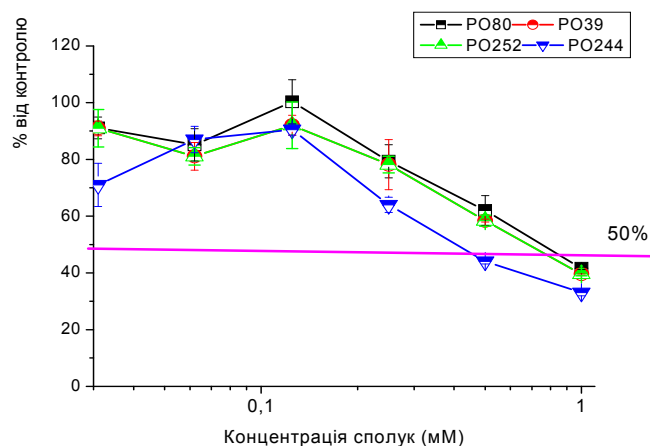


Рис.2. Криві виживаності (% від контролю) пухлинних клітин MCF-7 під впливом біметалічних сполук $[\text{Cu}(\text{en})_2\text{ZnCl}_4] \cdot \text{dmsO}$ (PO39), $[\text{Cu}(\text{en})_2][\text{Cd}_2(\text{CH}_3\text{COO})_6]$ (PO244), $[\text{Cu}(\text{en})_2\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_4]$ (PO80), $[\text{Cu}(\text{en})_2\text{CdBr}_4] \cdot \text{dmsO}$ (PO252).

протипухлинної терапії, що підтверджено відсутністю пухлин у 67,5% тварин даної групи в порівнянні з контролем (ріст пухлин без терапії) та групами тварин з введенням ТК та PO244, поокремо [9]. У останніх 32,5% тварин параметри росту первинної пухлини відрізнялись від контрольної зниженими темпами та розмірами пухлини. Для визначення механізмів сумісного впливу ТК та PO244 було проведено їх цитотоксичний скринінг на лінії клітин MCF-7 (рис.3).

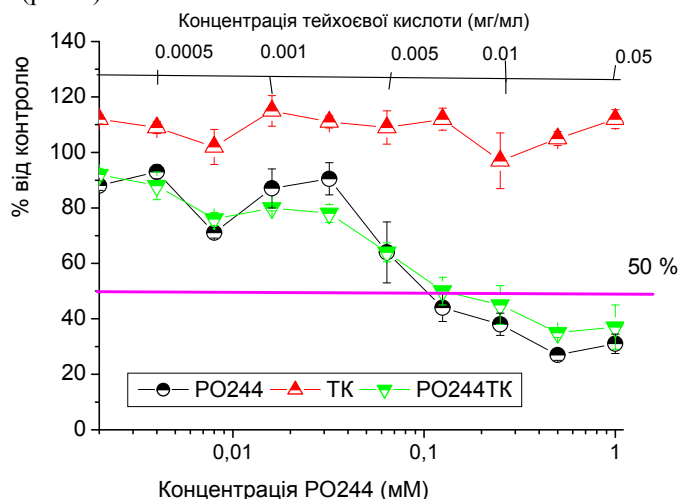


Рис.3. Криві виживаності (% від контролю) пухлинних клітин MCF-7 під впливом біметалічного комплексу $[\text{Cu}(\text{en})_2][\text{Cd}_2(\text{CH}_3\text{COO})_6]$ (PO244) та тейхоевої кислоти (ТК), окремо та комбіновано.

Однак, підсилення цитотоксичного ефекту PO244 за умов додавання ТК по відношенню до пухлинних клітин *in vitro* не виявлено. Так, при додаванні ТК до клітин MCF-7 в декількох дискретних концентраціях стимулює проліферацію клітин, а за даними підрахунку фракції живих та мертвих клітин, посилює їх виживаність (3% мертвих клітин проти 8% в контролі) та знижує апоптичний індекс майже вдвічі. За сумісного застосування PO244 та ТК

цитотоксичний/цитостатичний ефект обумовлено РО244. За попередніми даними, протипухлинний ефект даних сполук в комбінованому застосуванні *in vivo* обумовлений опосередкованою дією ТК імунотоксичними клітинами.

ВИСНОВКИ

Отже, в результаті дослідження механізмів протипухлинного та антиметастатичного впливу низки синтетичних сполук в окремому та комбінованому застосуванні на пухлинних клітинах *in vitro* було виявлено, що сполуки з найбільшою ефективністю протипухлинного впливу *in vivo* характеризуються найвищими показниками цитотоксичного/цитостатичного впливу *in vitro*.

Література

1. Alley M.C., Scudiero D.A., Monks P.A., et al. Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay // Cancer Research – 1988. – Vol. 48 – P.589-601.
2. Ackland M.L., van de Waarsenburg S., Jones R. Synergistic antiproliferative action of the flavonols quercetin and kaempferol in cultured human cancer cell lines // In Vivo. – 2005. – Vol.19, №1. – P. 69-76.
3. Semple T.U., et al. Tumor and lymphoid cell lines from a patient with carcinoma of the colon for a cytotoxicity model. Cancer Res. – 1978- 38: 1345-1355.
4. Soule H.D., et al. A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. J Natl Cancer Inst.- 1973.- 51: 1409-16.
5. Pat. 22204 (UA). Compound of 1,4-disubstituted 5-amino-1,2-dihydropyrrole-3-one having anticancer activity: G.G. Dubinina, Yu. M. Volovenko – 21.02.2006. Appl. U200601855. 25.04.2007.
6. Lynchak O., Ostrovska G., Rybalchenko V. (2009) Effects of new maleimide derivate on the 1,2-dimethylhydrazine-induced colon carcinogenesis in rats. Gut “GASTRO 2009 UEGW/WCOG, London”. 58: A334.
7. Козозей В.М., Гарманчук Л.В., Несцерова О.В. та ін. Застосування ацетатного комплексу міді та кадмію з етилендіаміном як протипухлинного та антиметастатичного засобу// Патент на корисну модель №36261 від 27.10.2008
8. Сенчило Н.В. Тейхоева кислота стафілокока та її імунобіологічні властивості//Автореферат дисертації.- Київ.2004, 22 С.
9. Senchylo N.V., Yavorska N.V., Garmanchuk L.V et al. Teichoic acid from Staphylococcus aureus increases antitumour and antimetastatic effects of the Heterometallic Cu/Cd complex // 5th International Symposium on Cell/Tissue Injury and cytoprotection/organoprotection/ Фізіологічний журнал.-2009, т.55,№1.-с.101.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЦИТОТОКСИЧЕСКИХ/ЦИТОСТАТИЧЕСКИХ ЭФФЕКТОВ ПРИРОДНЫХ И СИНТЕТИЧЕСКИХ АГЕНТОВ НА КУЛЬТИВИРОВАННЫЕ КЛЕТКИ

Гарманчук Л. В., Сенчило Н.В., Никулина В.В., Денис Е.О., Непийвода Х.Д., Николаенко Т.В., Остапченко Л.И.

В рамках данного исследования проводился *in vitro* скрининг перспективных противоопухолевых веществ. Тестировались агенты искусственного и натурального происхождения, а так же их комбинации. Среди синтетических агентов для производных малеида и дегидропиrolла была продемонстрирована цитотоксическая/цитостатическая активность на клеточной линии колоректальной аденокарциномы COLO-205. Биметаллические комплексы с этилендиамин в комбинации с тейхоевой кислотой оказывают цитотоксическое/цитостатическое влияние на культуру MCF-7. Следует отметить, что агенты, для которых характерен цитотоксический и антиметастатический эффект на индуцированных моделях опухолей, сходным образом действуют на опухолевые клетки в культуре.

Ключевые слова: MCF-7 та COLO-205 клетки, цитотоксический/цитостатический скрининг.

DETERMINATION OF CYTOTOXIC/CYTOSTATIC EFFECT NATURAL AND SYNTHETIC AGENTS FOR CULTURED CELLS

Garmanchuk L.V., Senchylo N.V., Nikulina V.V., Denis E.O., Nepiyvoda K.D., Nikolaenko T.V., Ostapchenko L.I.

This research reports on *in vitro* screening of promising anticancer agents. Natural and synthetic agents were tested. Among synthetic agents, maleimide and dehydropirol derivatives were investigated, which have shown cytotoxic effect on COLO 205 cell line, bimetallic complexes with ethylenediamine in combination with teichoic acid were cytotoxic for MCF-7. Agents have demonstrated cytotoxic and antimetastatic effects in both animal induced cancerogenesis model system and *in vitro* test system.

Key words: MCF-7 and COLO-205 cells, cytotoxic/cytostatic screening.

УДК 621.3-332

ТЕХНОЛОГІЯ ЕКОЛОГІЧНО БЕЗПЕЧНОГО ВИКОРИСТАННЯ НАНОПРЕПАРАТІВ У АДАПТИВНОМУ РОСЛИННИЦТВІ

Таран Н.Ю.¹, Бацманова Л.М.¹, Лопатько К.Г.², Каленська С.М.²

1 Київський національний університет імені Тараса Шевченка

2 Національний університет біоресурсів та раціонального природокористування

e-mail: l.batsmanova@gmail.com

Надійшла до редакції 08.09.2011

Представлена екологічно безпечна технологія застосування неіонного колоїдного розчину наночасток металів при вирощуванні озимої пшениці. Запропоновані технологічні заходи сприяють підвищенню врожайності на 20-25% та збереженню чистоти ґрунту в межах концепції раціонального природокористування. Резюме мовою основного тексту статті.

Ключові слова: наночастки металів, озима пшениця, передпосівна обробка, вегетаційна обробка, врожайність.

Дослідженнями, проведеними як у нашій країні, так і за кордоном, встановлено, що при кореневому живленні рослини поглинають з ґрунтового розчину велику кількість елементів (більше 70). На практиці найчастіше рослини забезпечуються трьома основними макроелементами (N, P і K) і недооцінюється важливість своєчасного внесення мікродобрив через їхню відсутність, дорожнечу, невідпрацьованість доз і співвідношень. Нині, коли різко знизилися обсяги внесення органічних і мінеральних добрив, фосфоритування і вапнування, недостатня увага приділяється бобовим та іншим сидеральним культурам, особливо помітно відбувається падіння родючості ґрунтів, їх гумусування, а, отже, забезпеченість рослин доступними формами макро- і мікроелементів. Нестача мікроелементів призводить не тільки до зниження врожаю, викликає ряд хвороб у рослин, а іноді і їх загибель, але і знижує якість їжі людини і тварин. Мікроелементи є активними центрами ферментів, поліпшують обмін речовин в рослинних. Тому проблема постачання рослинам мікроелементів має загальнобіологічне значення.

На практиці нерідкі випадки низької окупності внесених добрив, що обумовлюється низкою причин, однією з яких є нестача мікроелементів у живленні рослин. Найбільша ефективність впливу мікроелементів відзначається при достатній забезпеченості рослин основними елементами мінерального живлення - азотом, фосфором і калієм. З підйомом врожайності і підвищенням виносу поживних речовин рослинами з ґрунту, зростає роль мікроелементів в системі живлення рослин. Оптимізація режиму живлення рослин мікроелементами ускладнюється, з одного боку, дефіцитом рухомих форм мікроелементів в деяких ґрунтах, з іншого - зниженням біологічної активності

мікроелементів в результаті тривалого використання підвищених доз концентрованих безбаластних добрив. Все більше накопичується даних, що вказують на антагонізм між окремими макро- і мікроелементами: внесення високих норм фосфорних добрив знижує доступність рослинам цинку, калійних та кальцієвих - бору, азотних - міді і молібдену. Фонд доступних для рослин сполук мікроелементів при цьому скорочується, і вони стають дефіцитними навіть на ґрунтах, віднесених до добре забезпечених.

Традиційно в Україні і у світі проблему збагачення добрив для рослин, кормів для тварин життєво необхідними мікроелементами вирішують за рахунок солей важких металів і хелатних сполук, що за своїм складом і властивостями мало відповідають біологічним потребам рослин і тварин, і лише в незначній мірі засвоюються останніми. В результаті здійснюється накопичення солей важких металів у доквіллі, погіршується його екологічний стан, знижується якість отримуваних продуктів харчування.

Тому для нашої країни є актуальним випуск широкого асортименту мікродобрив зі збалансованим вмістом елементів і застосування їх в процесі виробництва екологічно чистого продукту з високим вмістом поживних компонентів. Одним із способів вирішення цієї проблеми може бути застосування нанопрепаратів у рослинництві для отримання екологічно безпечної та поживної продукції.

Нині нанотехнології є стратегічним напрямком економічного розвитку провідних країн світу про що свідчать обсяги фінансування даної галузі індустрії. За прогнозами Національної Ініціативи в галузі нанотехнології США (National Nanotechnology Initiative), розвиток нанотехнологій через 10-15 років дозволить створити нову галузь економіки з обігом у 15 млрд. доларів і близько 2 млн. робочих місць.

У рослинництві застосування нанопрепаратів, в якості мікродобрив, забезпечує підвищення стійкості до несприятливих кліматичних умов і збільшення врожайності (в середньому в 1,5-2 рази) майже усіх продовольчих (картопля, зернові, овочеві і плодово-ягідні) і технічних (бавовник, льон) культур [2]. Біологічно активні наночастки заліза можуть підвищити врожайність деяких зернових культур від 10 до 40% [6]. Очікується також позитивний вплив наноматеріалів на продуктивність фотосинтезу [1]. Нанотехнології застосовуються після збирання врожаю соняшнику, тютюну і картоплі, для зберігання яблук [7].

Нанопрепарати мають низку переваг порівняно з традиційними розчинами: не розшаровуються під впливом тепла і світла, приготовлений робочий розчин може зберігатися не години або дні, а роки, залишаючись при цьому активним. Проте найголовніше - нанопродукти забезпечують повне змочування поверхні рослин, повністю всмоктуються рослинами, не змиваються дощем. Виробники не приховують, що наноемульсії недешеві, але у результаті вони дають набагато більший ефект. Наприклад, обробка озимої пшениці препаратом "Титул Дуо, КРР" може забезпечити до 400% рентабельності і додатковий урожай до 17 центнерів з гектара [1].

Нанотехнології в сільському господарстві передбачають використання для підживлення та захисту рослин препаратів новітнього покоління. Широкого застосування для підвищення продуктивності й стійкості до абіотичних і біотичних факторів середовища набувають нанодисперсні порошки і колоїдні розчини біогенних металів. Механізми активуючої та захисної дії наноматеріалів в кожному конкретному випадку можуть бути різними і вимагають спеціального вивчення.

Теоретичний аналіз, дослідження і відбір інтегральних процесів та біохімічних маркерів дозволили нам сформулювати комплексну систему об'єктивної оцінки фізіологічного стану рослин при випробуванні наноструктурованих матеріалів для адаптивного рослинництва. Дана інформаційно-вимірjuвальна система передбачає визначення таких інтегральних характеристик фізіологічного стану рослин, як первинної та загальної стійкості за відносними показниками росту, фотосинтетичної продуктивності рослин та агроценозу, оцінювати стресовий стан рослин за первинною неспецифічною реакцією оксидного вибуху при порушенні окисно-відновного гомеостазу клітин та дозволяє визначити ефективну концентрацію, дозу та спосіб використання нанопрепарату.

Використання наночасток металів у системі підживлення може виступати додатковим чинником оптимізації росту і розвитку рослин, а також мікрофлори ґрунту. Ці процеси є найбільш дискусійними у міжнародній науковій спільноті, оскільки нанопрепарати отримані різними методом,

що й визначає їхні фізичні, хімічні властивості, токсичність та доступність для рослин. Окрім того досліджуються різні дози, термін впливу та способи внесення нанопрепаратів без урахування ґрунтово-кліматичних умов агроценозів. Узагальнюючи власні дослідження та наявну в літературі інформацію, картину процесу поглинання та транслокації наночасток нині можна представити наступним чином (рис.1). Проникність наночасток у тканини кореня і подальше їхнє транспортування по рослині залежить від виду наночастки. На кореневих волосках адсорбуються – наночастки цинку, алюмінію, вуглецеві фулерени. На поверхні екзодерми адсорбуються і далі не транспортуються – багатостінні вуглецеві нанотрубки, всі інші наночастки проходять крізь екзодерму в мезодерму. В мезодермі (корі) акумулюються наночастки церію, алюмінію (хоча іони алюмінію доходять до ксилеми), срібла (іони срібла потрапляють до ксилеми), міді (іони міді потрапляють до ксилеми), титану, одностінні вуглецеві нанотрубки. На рівні ендодерми залишаються наночастки цинку (іони цинку потрапляють до ксилеми). Через ендодерму проходять і акумулюються у камбію наночастки заліза. До ксилеми безперешкодно доходять вуглецеві фулерени, наночастки нікелю.

Отже, процеси поглинання і особливо транслокація для більшості наночасток не з'ясовані через малу кількість досліджень. Зрозуміло, лише, що окремі наночастки здатні до активної адсорбції на поверхні кореня, інші здатні до радіального та дальнього транспорту. Ці данні необхідно враховувати для адресної доставки рослинам необхідних компонентів та на їхній основі формувати фізіологічно обґрунтовані та екологічно безпечні агрозаходи використання наноструктурованих препаратів.

Окрім того, винятково важливе значення в розробці технології нами було приділено підбору екологічно безпечного способу отримання самих нанопрепаратів. Найбільш рентабельними, екологічними та ефективними методами отримання наночастинок є фізичні методи. Фізичними способами одержання наночасток металів володіє лише незначна частина компаній-виробників наноматеріалів, розташованих, в основному, в США, Великобританії, Німеччині, Росії, Україні.

При цьому Україна, завдяки відкриттю нового фізичного явища і розробці на його основі цілої групи нанотехнологій (ерозійно-вибухових нанотехнологій отримання наноматеріалів), має шанс увійти в світову групу провідних виробників наноматеріалів в цілому. [4].

До фізичних методів отримання наночасток належить, зокрема, електроіскровий метод.

Наночастинки, які отримуються, завдяки цьому методу, мають унікальні фізико-хімічні властивості. Основою процесу отримання наночастинок є електроіскрова обробка гранул заліза, марганцю, міді, цинку та інших металів. Головними компонентами, на

яких базується отримання наночастинок металів, є гранули, катод та анод (виготовлені з того ж матеріалу, що і гранули), робоча камера, бідистильована вода (діелектрик). Механізм отримання наночастинок логічно розділити на декілька етапів. На першому етапі завдяки генератору розрядних імпульсів електричний струм високої потужності (діапазон 2784 – 6960 Вт) та напруги

подається на електроди. Між катодом та анодом утворюється електричне поле, достатнє для пробію рідкого діелектрика. Водночас, від катоду до аноду починає рух потік електронів, який випаровує рідину, а в момент підходу потоку електронів до аноду у просторі між електронами та рідиною знаходиться газ та плазма.

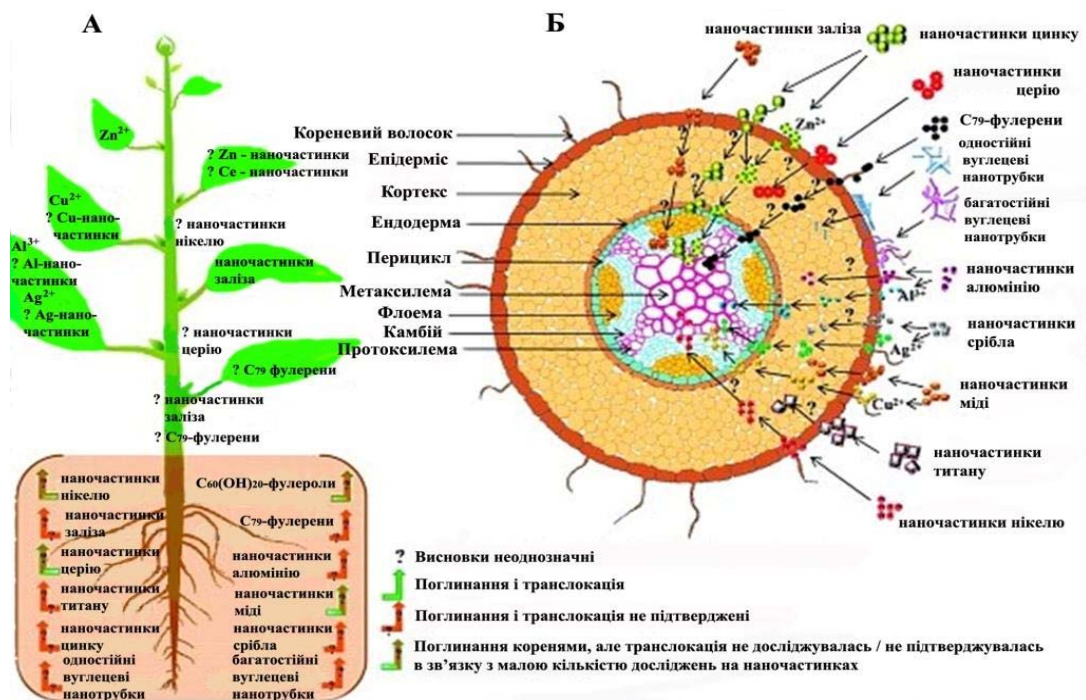


Рис.1. Поглинання та транслокація наноматеріалів у тканинах рослин [5]

На другому етапі після досягнення потоку електронів анода утворюється канал наскрізної провідності, через який електрична система імпульсно вивільнює накопичену нею енергію (діапазон 4000 – 30000°C). Водночас, анод руйнується, плавиться, цей процес супроводжується дробленням газового простору на дрібні порожнини та їх схлопуванням, утворюються додаткові ударні хвилі, які при контакті з частинками руйнують їх. В залежності від потужності та тривалості імпульсу кількість розплавленого та випаруваного металу може змінюватися у діапазоні від 95 і 5% до 5 і 95 %, відповідно [3].

Водний розчин наночастинок металів (Fe, Zn, Mn, Ag, Cu), отриманий електроіскровим методом, представляє собою ядро з металевої фази, вкрите оксидною оболонкою, відмінною за вмістом кисню. Розділення частинок за розмірами достатньо вузьке. Максимальний розмір не перевищує 100 нм. Дози внесення – надзвичайно малі: для передпосівної обробки 1л розчину на 3-4 га, за позакореневого внесення 1-2 л на га, що відповідає 1-3 мкг/м², що є на порядок меншим від норм внесення відомих хімічних препаратів для обробки. Наночастинки, отримані на основі технології електроімпульсних вибухів у воді, є надзвичайно малих розмірів (декілька сот атомів),

практично повністю хімічно й електрично нейтральні. Вони вкриті наногідратною оболонкою, яка легко заміщується оболонкою з біосумісних органічних молекул.

Таблиця 1

Характеристика колоїдного розчину наночастинок металів

Метал	Концентрація мг/л	Середній діаметр, нм	Фазовий склад
Ag	150	30-50	Ag, Ag ₂ O
Cu	200	100-150	Cu, CuO, Cu ₂ O
Fe	300	20-30	Fe, Fe ₂ O ₃ , Fe ₃ O ₄
Zn	150	30-50	Zn, ZnO
Mn	150	20-30	Mn, Mn ₃ O ₄ , Mn ₂ O ₇

Цей спосіб отримання наночастинок запатентований [2] та стандартизований за якістю наночастинок у дослідних партіях.

Унікальною особливістю наночастинок металів, яка відіграє ключову роль при їх використанні в агропромисловому комплексі, є низька токсичність, що зумовлює перспективність їх використання на ринку нанопродуктів. Токсичність наночастинок металів

набагато менша токсичності їх солей: міді – в 7 раз, цинку – 30 разів, заліза – 40 раз. Маючи надзвичайно високу активність і розміри, що відповідають розмірам живих клітин, біогенні метали більш ефективно і безпечно сприймаються рослинами в якості мікродобрив. В результаті значно зменшуються норми внесення життєво необхідних мікроелементів та знижується ризик можливих негативних наслідків для довкілля від передозування добрив.

Випробування новітніх видів мікродобрив у вигляді водних розчинів колоїдних наночастинок металів проводилось нами з урахування фізіологічних, біохімічних та екологічних складових технологій адаптивного рослинництва. Схема досліджень передбачала обробку насіння сумішшю наночастинок металів (Fe, Mn, Zn, Mo, Co, Cu, Ag), та вирощування рослин за різних варіантів (доз) мінерального підживлення.

Передпосівна обробка насіння наночастинами металів достовірно сприяла збільшенню врожаю пшениці у комплексі із застосуванням мінеральних добрив. Показники врожайності рослин, що вирости із обробленого наночастинами металів насіння у варіанті N₁₅₀P₁₅₀K₁₅₀, зросли майже вдвічі (88%) порівняно з контролем та на 28% відносно варіанту лише із внесенням мінеральних добрив (рис.2).

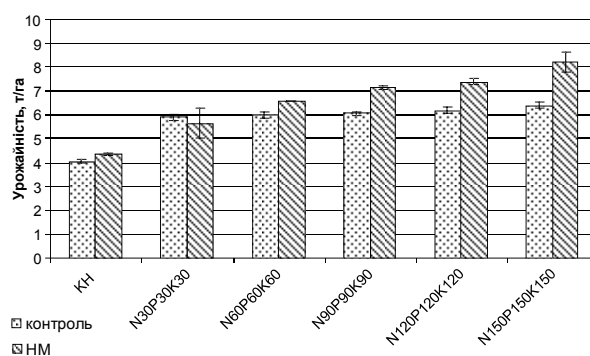


Рис. 2. Вплив наночастинок металів та різних доз мінерального живлення на урожайність пшениці озимої, т/га

Застосування колоїдного розчину наночастинок для передпосівної обробки насіння пшениці озимої оптимізує процеси росту й розвитку, починаючи від проростання насіння, сприяє збільшенню вегетативної маси рослини восени, що є запорукою успішної зимівлі посівів. Активізація ростових процесів спостерігалась на всіх етапах розвитку рослин, особливо у варіантах з поєднанням добрив з наночастинами, що свідчить про здатність наночастинок оптимізувати використання добрив рослинами, зумовлену активізацією метаболічних процесів загалом.

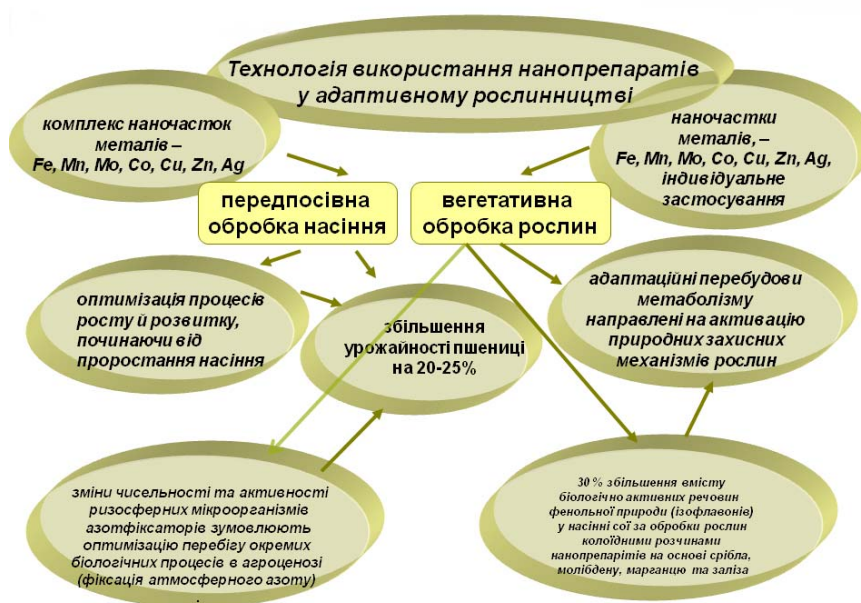


Рис. 3. Схема використання нанопрепаратів.

За інтегральними маркерами фізіологічного стану рослин визначено, що вегетаційна обробка рослин пшениці препаратом колоїдних розчинів наночастинок металів мобілізує систему антиоксидантного захисту рослинного організму, сприяє підвищенню фотосинтетичної продуктивності, що визначає її ефективність для формування адаптаційних процесів рослин впродовж онтогенезу.

ВИСНОВКИ

Підсумуючи проведені технологічні випробування нанопрепаратів, ми можемо рекомендувати для практичного застосування як екологічно безпечну технологію передпосівної обробки насіння наночастинами металів.

За вегетаційної обробки надземної частини відбувається потрапляння наночастинок у ґрунт та активуються ґрунтові мікроорганізми, що не завжди є

позитивним. Для рослин здатних до утворення мікоризи (як у нашому випадку пшениця) ми спостерігали позитивний ефект. Для інших культур необхідно підбирати свої екологічно обґрунтовані технології враховуючи дозу та пролонгованість дії нанопрепаратів.

Роботу виконано за фінансової підтримки Державного агентства з питань науки, інновацій та інформатизації України (за договором № ДЗ/ 493-2011 від 29 вересня 2011 р.)

Література

1. Бовсуновський А.М., Вялый С.О., Каплуненко В.Г., Косинов Н.В. Нанотехнология как движущая сила аграрной революции //Зерно.- 2008.- № 11(31).- С.80-83.
2. Лопатько К.Г., Афтандіянц Є.Г., Каленська С.М., Тонха О.Л. «Спосіб отримання неіонного колоїдного розчину металів».- Патент на винахід №38459 від 12.01.2009//Бюл. -2009.-№1.
3. Лопатько К.Г., Афтандіянц Є.Г., Зауличный Я.В., Карпец М.В. Получение и применение наночастиц, содержащих медь и серебро.- 2010.- 233-243//www.nbuv.gov.ua/portal/natural/Teke/2010/10ekgmis.pdf
4. Национальные инновационные программы в области развития наноиндустрии за рубежом. Аналитический обзор//NanoWeek.-2010.-127 с.
5. McKnight T.E., Melechko A.V., Griffin G.D., Guillorn M.A., Merkulov V.I., Serna F., Hensley D.K., Doktycz M.J., Lowndes D.H., Simpson M.L. Intracellular integration of synthetic Nanostructures with viable cells for controlled biochemical manipulation // Nanotechnology. – 2003. – Vol. 14. – P. 551-556.
6. . Racuciu M, Creanga D. Cytogenetic changes induced by beta-cyclodextrin coated Nanoparticles in plant seeds. // Romanian J. Phys.- 2009.- V.54.- P. 125–131.
7. Sozer, N.; Kokini, J.L. Nanotechnology and its applications in the food sector. //Trends Biotechnol. – 2009.- Vol. 27.- P. 82–89.

ТЕХНОЛОГИЯ ЭКОЛОГИЧЕСКИ БЕЗОПАСНОГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ НАНОПРЕПАРАТОВ В АДАПТИВНОМ РАСТЕНИЕВОДСТВЕ

Таран Н.Ю., Бацманова Л.М., Лопатько К.Г., Каленская С.М.

Представлена экологически безопасная технология применения неионного коллоидного раствора наночастиц металлов при выращивании озимой пшеницы. Предлагаемые технологические мероприятия способствуют повышению урожайности на 20-25% и сохранению чистоты почвы в рамках концепции рационального природопользования

Ключевые слова: наночастицы металлов, озимая пшеница, предпосевная обработка, вегетационная обработка, урожайность.

TECHNOLOGY OF ECOLOGICALY SAFE USING OF NANOPREPARATION IN ADAPTIVE CROP CULTIVATION

Taran N.Yu., Batsmanova L.M., Lopatko K.G., Kalenska S.M.

Ecologically safe technology of application of non-ionic colloid solution of metals nanoparticles for winter wheat cultivation is presented. The proposed technological activities contribute to higher yields of 20-25% and preservation of the soil within the concept of rational resources using.

Key words: nanoparticles of metals, winter wheat, presowing treatment, vegetation treatment, yield.



LIFE IN THE FUNDAMENTAL NOTIONS OF THE PHYSICS OF THE ALIVE

Sit'ko S.P.

*K The Institute of the Physics of the Alive by the International Charity Fond of Sergiy Sit'ko,
 Київ, Україна;
 e-mail: sergsitko@gmail.com*

Was received 27.09.2011

In the notions of the physics of the alive the self-functioning living objects* are the entirety quantum-mechanical systems occupied the fourth step of the quantum ladder of nature - after nuclear, atomic and molecular ones (the Weisskopf's classification [1]). The self-consistent potentials of living objects, ensuring the quantum-mechanical scenario of the life, are realized in accordance with a genome as the coherent eigenfields in mm-range of electromagnetic waves. Such a fields – electromagnetic models of the alive (specificly human being) due to force of coherence possess of the superstability, which permits them to check and maintain the retranslation of genome on organism permanently through the standard mechanisms of biochemical heredity. The stability of organisms in the variable environment (temperature, pressure, humidity and so on) is achieved in nature by existence in the superconductivity (due to coherence) electromagnetic, framework of the alive the “normal threads” (trajectories of Poincare's limit eyeles – Chinese meridians), ensuring the superconductivity just the second type [2]. The diseases which cannot be overcome by organism itself arise exclusively through the deformation of self-consistent potential which retranslates the genome, i.e. by means of creation of metastable states. Elimination of these states, realized by solitary quanta with using of methods of nuclear, atomic and molecular spectroscopy, is ensured with the technologies of the quantum medicine. As a result the sciences about the alive – and, in the first place, biology and medicine – have being received the possibility to become the fundamental sciences.

Key words: physics of the alive, quantum medicine, synergetics, quantum mechanics, fundamental entity of life, Weisskopf's quantum ladder of nature, limit cycles of Poincare, the nature of Chinese meridians and points of acupuncture, electromagnetic model in the problem of realization of genome.

We are witnesses of the strange situation : nobody doubts that the alive differs from the dead, life - from death, but, at the same time, dozens of biological and medical sciences, the task of which must have been the support of life in its opposition to death, were not imbued with the phenomenon of life, considering it as a singularity which is beyond the limits of science. It is absurdity and, in reality, such type of activity cannot be considered as scientific one, at any rate, as occupation of fundamental science. It's expedient to remind here, that nowadays there exists distinctly defined notion of fundamentally in the natural sciences. They are the sciences based on quantum mechanics, principles of which - identity and discreteness – ensure the discrete spectrum of characteristic eigenfrequencies of the objects studied into these sciences. V.Weisskopf [1] was the first one who drawn attention of the scientific world community to this fact, having emphasized, that just the noted principles ensure diverse differential stability of the nature at nuclear, atomic and molecular levels. Weisskopf introduced the notion about three stages of quantum organization of nature or, as it often said, three steps of Weisskopf's Quantum Ladder. Guided by the well –

known facts of the overlapping levels in the energy spectra of many molecules structure (due to the screening mechanism and strong couple in solid state and liquids), Weisskopf has guessed that the third, molecular level was the last one of quantum organization of nature, and molecular physics was the third, and the last fundamental science, respectively. At the same time in nature, besides nuclei, atoms and molecules, there is also at least one more class of objects which are characterized by diverse differential stability as well. There are the living being.

Life is not a substance that constantly varies its form and structure as «the ocean of life» in the well-known film «Solarys». The earth, water, air are inhabited by quite discrete representatives of flora and fauna.

We, I mean the humans, are also much alike to each other, but each of us has individual features of appearance which remain unchanged so that we recognize ourselves (in a mirror) and our acquaintances when we see them. Thus there arises a temptation to explain diverse differential stability of the alive by the same principles – identity and discreteness – and, accordingly, to consider the living systems as the whole quantum-mechanical entities.**

* in their fundamental entity; ** We must do justice to Weisskopf: drawing schematically his quantum ladder, he has also drawn the fourth step with discrete energy levels – the step of life – as early as in 1972. With no comments, just a foresight of a genius.

Just therefore the discovered in 1982 «manifestation of characteristic eigenfrequencies of human organism»[3] was the drastic step to the forming of conception «life as the fourth level of quantum organization of nature»[4,5]. Moreover the discovery has been made through the experiments.

In the seventies of last century the radiophysics of the different countries were developing (and had developed) the mm-range of electromagnetic waves. The pioneer here was the Kharkov scientists (Ukraine). One of them, I.Zalyubovsky offered his wife, N.Zalyubovskaya (biologist, the post graduate of prof. V.G.Schahbazov (Kharkov university) to investigate the influence of artificially received mm-radiation on the living systems. I take the opportunity to note that the Earth is reliably closed for outside sources of mm-radiation (and first of all going from the sun) with the atmosphere: 1 mm of water decreases the intensity of this radiation in 1000 times.**

N.P.Zalyubovskaya had gathered the great experimental material by studying influence of frequency and power of this radiation on plants and protozoa and has come to conclusion (which was defended for degrees of D.Sc. and Ph.D.) about unexpected and sharp dependence of the vital activity of the alive from small changing of the frequency of radiation [7]. I am underlining once more, that from the point of view of the notions of that time it must not be because mm-range is out of area of molecular quantum transitions and in ordinary solid states and liquids such radiation cannot induce resonance type function of response.

A bit later two physicians (oftalmologists) from Odessa (Ukraine) – I.S.Cherkasov and S.V.Nedzvetsky – trying to treat eye with the standard technologies of skin-effect, used as a generator of high frequency, generator mm-range (instead of the generator of plants device which gone bad) and revealed that in time of treatment of the eye the gastric ulcer of the patient which cannot be overcome with the ordinary medicine during some tens years, disappeared without trace [8].

And, at last, we have succeeded in showing that therapeutical effect on some frequencies (called with therapeutic, or resonance ones) in case of acting on special biology active points BAT (they coincide with the points of acupuncture) realizes using the intensity of influence in hundreds billions times smaller than before used in medicine, i.e. on the intensity, compared with separate quanta $\sim 10^{-21}$ W/Hx cm² [3].

So, what we have?

From one side, a kind of indisputable revealing of the quantum-mechanical nature of the alive, but, from other side, the centuries –old scientific tradition beginning from the atomistic ideas of Demokritus and included the revolution of the nature in the beginning of the last century, which, has no doubts that fundamental scenario

of the nature, guided to the new quality, put on an act exclusively on the microscopical level.

But the events of the second half of XX century, connected with the creation of two sciences of self organization with local decrease of entropy – synergetics (G.Haken) and theory of dissipative structure (I.Prigogine) – have shaken this assurance.

I have analyzed the regulations of quantum mechanics and come to conclusion that microscopicality of the objects is not a criterion of its application. Actually the necessary condition for quantum-mechanics application is existence of entire self-consistent potential created by the structures with identity spectral characteristics of every. The premises for creation of such potential in a human organism exist.

Indeed:

1. in every from 10^{18} cells of living organism there is total and exhausted information about whole body – total genome;

2. eigenvibrations of cytoplasmic cell's membranes of all living systems, as was shown by Frohlich [9] lie within ($10^{10} - 10^{11}$) Hz range;

3. Mitchell has been awarded Noble prize for revealing [10] that most part of the metabolism energy cells spend not on storage of chemical energy (cycle ADF – ATF) as there is considered before, but on the creation and constantly maintaining of the great tension of electric field on cytoplasmic membranes, up to 10^5 V/sm, that is the limit even for today modern technologies.

So, there are all grounds to guess that cell's membranes could quit well play the role of active centers in creation of laser type self-consistent potential, in which the genome is retransmitted on the language of characteristic eigen-frequencies of organism. This potential on the 14th week of development of embryo initiates «the spontaneous breaking» of initial symmetry of the mother's organism in the embryo volume (the first birth) and from this time the future organism begins to form himself in selfconsistence with formation of its coherence eigenfield in mm-range of electromagnetic waves [11].

The other definition of this fundamental structure of the alive in its distinction from the dead, which created during the different lighting of the problem: the God's defence, electromagnetic framework, electromagnetic model.

The self-consistence between electromagnetic model of organism and body continues after the official second birth of child, keeping in control the retranslation of genome and ensuring the restoring of the disturbed structure of body (wounds, fractures and other) during the whole life. Such approach permits to refuse from the deadlock (from the point of view of science) seeking of genes, which ought to respond for something, reviving the anthropomorphism in the III millennium. **Genes are the place of storage hereditary information, but its realization goes on by the creation, in accordance with genome, the electromagnetic model on the mighty**

** Not accounted the window of transparency for relict irradiation which just lies in the range of (50-60)HZ and reaches the Earth. This fact has induced me together with academician M.Lisitcha to publish at that time the suitable article [6].

coherence field of laser type, on which the outward world could not affect.*

And our body (being vulnerable enough) whole time compares with this model. This correction is realized by the standard mechanisms of biochemical heredity: DNA replication, RNA transcription, protein translation. Thus, if self-consistent potential is symmetrical, i.e. electromagnetic model tunes to genome totally, body also matches to genome and does not need in outside correction. With the exceptions of extreme situations – necessity to put out bullet from a body, to sew up the deep wound or to put together bones after accident. All others organism makes itself. But the picture changes if (due to special reasons, to which we shall come back other time) the self-consistent potential gets deformation, there creates in it supplementary metastable well, which is fulfilled by the levels according to the quantum mechanics laws, between levels there creates transitions, frequencies (and energies) of which has no relation to genome. From this moment the electromagnetic framework is formed by the false program and in the body there creates diseases which relate to the category of "hard" or "incurable" onses. Naturally that in such situation it is useless the efforts of doctors the same as healers and specialists of spiritual and mentality practices – after all the deformation of the framework has occurred on the quantum-mechanical level and therefore the restoration of its symmetry could be occurred only on the same level. Luckily, nuclear, atomic and molecular spectroscopies have in their arsenal the methods of the resonant gone out system from metastable state. Quantum medicine uses these approaches developing its technologies which were named Microwave Resonance Therapy (MRT) [12,13].

But, is there exist more direct than therapeutic canal for receiving information about coherence eigenfield of organism?

If turus out, that yes exist. And we have received helping in that from Ancient Chinese Medicine. In accordance with it human body is penetrated by the 26 channels, or meridians (12 paired and 2 unpaired) internal tracks of which are going through the main organs of a man (stomach, liver, heart and so on), and external tracks are situated at the surface of a body in the acupuncture points (in terminology of modern medicine – biologically active points – BAP). Metrics of Ancient Chinese Medicine was out of standart: distances between points of acupuncture and distances between organs of body had been measured in the units, which themself were defined by anatomic characteristic of a particular organism. This unit was called «cun» and more often it is approximately the width of a thumb in the plane a nail in the joint, that is this value for the grown-up person with

common anatomic proportions constitutes approximately 2.5sm. Moreover, as things turned out that 11 from 12 paired meridians begin or finish on the tips of fingers or toes in area of nails [14]. Once more peculiarity of the meridian- acupuncture network, covering an organism and had left to us as the heritage by Ancient Chinese wiseacres is the obligatory existence of BAP in the center of flexions of each joint of the limbs.

The official West medicine sceptically related and, I dare say, now relates to the notions of Ancient Chinese men of wisdom in spite of undeniable achievements of their medicine. The point is, that the West medicine based on the so-called chemical paradigm adheres to the visualization principle claiming that there actually exists and can be an object of scientific research in an organism only something that can be seen directly by an eye or with the help of a microscope. But neither meridians nor points of acupuncture satisfy this criterion...

We have succeeded in proving of reality of the meridian-acupuncture network, and in showing that she is an element of electromagnetic framework – coherence eigenfield of organism, about which I wrote upper and forming of which begins, as I noted, on the 14-th weeks of the development of embryo in the result of spontaneous breaking of symmetry. At the beginning there create the running waves which moving along the body of embryo initiate the hardening of cartilages of the limbs (turning them into the bones) and hardening of the nails. In the result, the running waves move along the arms and legs to put from inside on the skin at angle of the complete internal reflection, forming in such a way points of acupuncture. The running waves are reflected from the nails and in result of summing direct and reflected waves on the concave screens of the soft flesh of the tips of fingers and toes of the limbs creates the dynamic interferential images of eigen-waves of organism which could be seen as papilar patterns by everybody. These pictures are the universal passport of the future person. The overlapping of the reflected wave on the direct one on all other places forms the meridian as a dynamic waveguide, filled by the standings waves, though which the lightexitons are moving ensuring coherence of the whole electromagnetic framework [15,16]. Such an interpretation gives good reason to apply the electrodynamics laws in the attempts to understand the peculiarities of the metric scale used in Ancient Chinese Medicine, and the peculiarities of the trajectories of the meridians themselves as well. Starting from the experimentally measured diameter of cylindrical waveguide (at least at the spots of their nearing the surface in acupuncture points)(3-5) mm and the refraction index inside the channel $n=1$ (the same as in atmosphere, but not (5-6) as in the body outside the channel areas) the solution of axially symmetric problem in cylindrical coordinates with using the first root approximation in cylindrical Bessel function of the first degree and zero order, gives for wave length in waveguide λ_z :

* Let's recall the famous experiments of 1963 on appraising of the 'force' of coherence, when the spreading of laser bean which has been send to the Moon was, by different evaluations, from 6 to 100 metres!

$$\lambda_z = \frac{\lambda_0}{\left[1 - \left(\frac{\lambda_0}{1,3 \cdot d}\right)^2\right]^{\frac{1}{2}}}$$

where $\lambda_0 = (5-6)$ mm – wave length in atmosphere and $d = (3-5)$ mm;

Putting in, we have $\lambda_z = (5-6)$ cm.^[5]

In a standing wave formation the distance between the maxima (and minima) equals the half of the wave length, i.e. (2,5-3) cm, that, as we see, conform the average meaning of a **cun**. Having received this result some years ago, I paid my attention that the value of λ_z given by this formula, was very sensitive to the relation $\frac{\lambda_0}{d}$.

Having discussed this fact I wrote: «...formation and support of the meridian proper in the body in accordance with genome, represents a self-consistent process, when **depending on the state of an organism the meridian diameter d can «breathe» by fractions of millimeter...**» [5]. Some later, analysing the peculiarities of the macroscopic quantum mechanics, I came to the conclusion that macroscopicity of the entire quantum-mechanical object means its superconductivity and presence inside of it the dynamic waveguides as a normal threads (in the terminology of physics of superconductivity) stabilizes the state of superconductivity in the variable outside world through the changing the of these threads diameters. So, the living systems (in their fundamental entity) are the

superconductors of the second type and entire quantum-mechanical objects simultaneously^[2]. Underline once more that under «fundamental entity» I mean the coherence eigenfield of organism, its electromagnetic framework. The human body is not a field and possesses of all features of substance: resistance to current, density, chemical composition, optical properties and so on.

Working with the great mass of patients of quantum medicine (some hundred thousands peoples), we met up with the extraordinary phenomenon, called by us the «Rudenko's effect». Due to this effect we have succeeded in visualization of the outside tracks of meridians for the first of our time. The effect was consisted in such, that in time of tuning on resonance (therapeutic) frequency acting (as I noted) on the point of acupuncture some of meridian with mm-radiation of intensity about 10^{-21} W/Hz•cm² the patient's (Rudenko) feet (he lies with the closed eyes) begin to jump on the high about (15-20)cm with the frequency about 1 Hz. The jumping was eliminated in two cases: gone out from the therapeutical frequency and in time of creation Zeeman's splitting with ordinary school-using magnet, bringing up to the any point of this meridian. In the result we have succeeded not only in tracing the outside track of the stomach meridian and compared it with the atlas pictures (fig. 1) [17], but there was opened the potential possibility in the macroscopical quantum-mechanical system to estimate the Lande's factor.

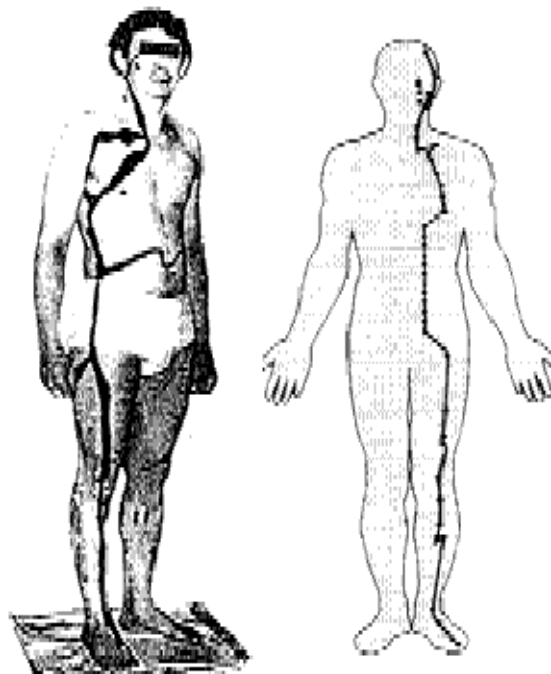


Fig.1. «Rudenko's effect»: **left** – image of the experimentally revealed outside track of the Stomach meridian; **right** – standart image of the Stomach meridian in an atlas of acupuncture.

I attract your attention that patient Rudenko some time ago came through an operation on the stomach – we can see that the meridian of stomach cannot move through the scar. This is the warning of the existing surgery about the

necessity to take info consideration the modern notions about life.

On the figure we can see also the experimentally estimated fragments of the other leg's meridians.

Unfortunately, these experiments exerted loading on the organism of patient. My doctor-assistants were compelled to cease the experiments and recovered Rudenko with the standart technologies of quantum medicine, but after this the « Rudenko's effect» had disappeared - now there remains only the documentary film about this...

Localization of the points of acupuncture on the arm's and leg's meridians, which has received on base of the notions about their formation in the result of moving the primary running wave between bone and skin with

reflection from skin at angle of the complete internal reflection in the forming in such a way points of acupuncture (fig.2) [11] which are conformity with atlas of acupuntury [14]. There is exist optical-physics explanation the obligatory presence of BAP in the center of flexions of each joint of the limbs. If it would be not so the any moving in the joint will induce the changing of the position of points of acupuncture on meridian or the opening of meridian to space. The first and the second will accompany by pains, especially, in area of joint, that indeed realized even on the first stage of its deformation.

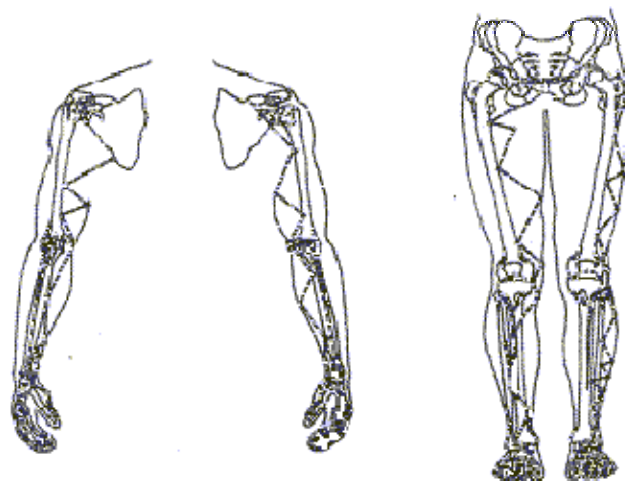


Fig.2. Localization of the points of acupuncture on the limbs of human body in the notions of physics of the alive.

By the way, experience of quantum medicine shows that pain is the reaction of organism on the deformation of electromagnetic framework, but not on the pathology of body itself.

And now once more essential remarks.

The formation of the alive as the entire quantum-mechanics entity goes through synergetics scenario, hierarchy succession of the dissipative structures. And here on the last stage of tuning synergetically and quantum-mechanically approaches there used the Poincare solutions of nonlinear differential equations around special points (other commen solutions of nonlinear differential equations are not exist). We have some typies of such solution (depending on value and sign of the determinant in the characteristical equations): knot, focus, saddle, limit sycle. The stable solution is the limit sycle. There is no real part of time and therefore it easy interpreted in the terminologies of quantum mechanics as orbitals (Bor's type), and in the notions of physics of the alive as their spatial solutions there exist meridians. "Special point" as in time of Poincare, now and in the future was, is and will be out of science and reflects God's in every living objects.

I realize that the real science about life is only beginning just now [18]. But it is beginning of the fundamental science [19] and medicine of the third millennium, without any discuss, ought to be based on it.

References

1. *Victor F. Weisskopf*: Physics in the Twentieth Century: Selected Esseys; The MIT Press, Cambridge, Massachusetts, and London, England, 1972. (Russian translation: *В. Вайскопф*: Физика в двадцатом столетии. // Москва, Атомиздат, 1977, с. 267 (с. 46-53).
2. *Rose-Innes A. C., Rhoderick E. H.* //Introduction to Superconductivity, Pergamon Press, 1969.
3. *Андреев С. О., Білий М. В., Сітько С. П.* Проявлення власних характеристичних частот організму людини // Доп. АН УРСР. Сер Б – 1984 - № 10, с. 56-59.
4. *Sit'ko S. P.* Life as a Fourth level of Quantum Organization of Nature // Proceeding of the International Workshop: Energy and Information Transfer in Biological Systems – Acireale, Catania, Italy, 18–22 September 2002, World Scientific, New Jersey – London – Singapore – Hong Kong, P. 358 (P. 293-307).
5. *Сітько С. П.* «Жизнь как четвертый уровень квантовой организации природы» // Биомедицинские технологии и радиоэлектроника, №1, 2007, ст. 39-50.
6. *Лисиця М. Н., Сітько С. П.* // Ще одна загадка реліктового випромінювання? // Укр. фіз. журнал т.39, №9,10 (1994) с. 973-975.
7. *Залюбовская Н. П.* К оценке действия микроволн миллиметрового и субмиллиметрового диапазона на различные биологические объекты. Автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук. – Харьков, 1970. 15 с.
8. *Черкасов И. С., Недзвецкий С. В.* //Способ лечения поврежденных биологических тканей// Авторское свидетельство №733697, 1980(СССР).

9. *Fröhlich H*, Theoretical Physics and Biology // Biological Coherence and Response to External Stimuli // Ed. by Fröhlich H. – New York: Springer-Verlag, 1988.
10. *Mitchell P*. Chemiosmotic Coupling and Energy Transduction, 1968.
11. *Sit'ko S. P., Gizko V. V.* Towards a Quantum Physics of the Living State // *Journal of Biological Physics*, v.18, №1 (1991), p. 1-10.
12. Мікрохвильова резонансна терапія у практичній діяльності сімейного лікаря. (Медичні рекомендації) Київ – 2004. МОЗ України.
13. *Сітько С. П.* «Спосіб мікрохвильової резонансної терапії С. П. Сітька», Патент України № 2615 від 15.03.1994; *Сітько С. П.* «Способ С. П. Сітько микроволновой резонансной терапии», Патент Российской Федерации №2053757, от 10.02.1996; *Sit'ko S. P.* “Microwave Resonance Therapy”, US Patent №5.507.791, Apr. 16, 1996.
14. *Табеева Д. М.* Руководство по иглорефлексотерапии – Москва: Медицина, 1980.
15. *Sit'ko S. P., Tsviliy V. P.* Electrodynamic Model of the Human Organism's Electromagnetic Frame // *Physics of the Alive* v.5, №1 (1997), p. 5-8.
16. *Sit'ko S. P., Tsviliy V. P.* “Space – Time Structures” of Synergetics in Physical Terms of Quantum Mechanics // *Physics of the Alive*, v.7, №1 (1999), p. 5-11.
17. *Sitko S. P., Andreev E. A., Dobronravova I. S.* The Whole as a Result of Self-Organization. // “*Journal of Biological Physics*”, vol.16, (1988), p.71-73.
18. *Сітько С. П., Мкртчян А. Н.* Введение в квантовую медицину. Киев: «Паттерн», 1994, 147с.
19. *Schrödinger E.* What is the Life? 1943.

